



From The Physiological and Neurophysiological Laboratories,  
The Caroline Institute, Stockholm.

## Selective Suppression with Ethylalcohol of Inhibition in the Optic Nerve and of the Negative Component P III of the Electroretinogram.<sup>1</sup>

By

C. G. BERNHARD and C. R. SKOGLUND.

(With 7 figures in the text.)

---

It is known that what is nowadays called the negative component PIII of the electroretinogram in general is the most resistant component to different agents such as cold (NIKIFOROWSKY, 1912) massage (WALLER, 1909, GRANIT and RIDDELL, 1934) ether, asphyxia (GRANIT, 1933) and potassium (THERMAN, 1938). So far it has not been possible to find a substance leaving the dominating positive component PII relatively intact and selectively attacking PIII. The nearest approach to this condition are some experiments by GRANIT and RIDDELL (1934) demonstrating dark adaptation to lead to a diminished PIII and an enlarged PII.

Now we have found alcohol selectively to depress the negative PIII and this effect will be described below. Some experiments with the optic nerve showed that at the same time the very marked and now well-known phenomena of inhibition in the optic nerve, found by GRANIT and THERMAN (1934, 1935) with whole nerve and confirmed and analysed by HARTLINE (1935, 1937, 1938b, see summary 1940) with single fibres, are also selectively suppressed by alcohol.

---

<sup>1</sup> Received 4 January, 1941.



# ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. 2

\*

## REDACTORES

*Y. REENPÄÄ*  
*Helsinki*

*A. KROGH*  
*Kjöbenhavn*

*E. LANGFELDT*  
*Oslo*

*G. LILJESTRAND*  
*Stockholm*

## COLLABORANTES

G. AHLGREN (Lund), Y. AIRILA (Helsinki), E. L. BAOKMAN (Uppsala),  
G. BLIX (Uppsala), J. BOCK (Kjöbenhavn), R. EGE (Kjöbenhavn),  
H. v. EULER (Stockholm), U. S. v. EULER (Stockholm), A. FÖLLING  
(Oslo), R. GRANIT (Stockholm), G. GÖTHLIN (Uppsala), E. HAMMARSTEN  
(Stockholm), E. HANSEN (Kjöbenhavn), K. HANSEN (Oslo), G. KAHLSON  
(Lund), F. LEEGAARD (Oslo), J. LEHMANN (Göteborg), J. LINDHARD (Kjö-  
benhavn), E. LUNDGAARD (Kjöbenhavn), R. NICOLAYSEN (Oslo), S. ÖR-  
SKOV (Aarhus), A. V. SAHLSTEDT (Stockholm), F. SOHÖNHEYDER (Aarhus),  
P. E. SIMOLA (Helsinki), T. TEORELL (Uppsala), H. THEORELL (Stockholm),  
T. THUNBERG (Lund), A. WESTERLUND (Uppsala), E. WIDMARK (Lund),  
A. I. VIRTANEN (Helsinki)

---

1941

## Technique and Procedure.

The retinal action potentials were recorded with a three stage directly coupled push-pull amplifier, the impulses in the optic nerve with a condenser coupled amplifier both connected to a cathode ray oscillograph.

Both white light from a 100 watt bulb and monochromatic light were used, the latter when records were taken from the nerve, as it so happened that the unit built for this purpose was in constant use in this laboratory for colour work in the manner described by GRANIT and SVAETICHIN (1940).

Frogs (*Rana temporaria*) were used in all experiments and the technique of leading off from retina and nerve was the one standardized in the papers referred to. When light adaptation was required the frogs were adapted to 20,000 m. c. in our standard apparatus, described by ZEWI (1939).

The alcohol was dissolved in Ringer's solution (5—20 %) and pipetted into the excised opened eyes on to the remains of the vitreous body. Solutions of 10 % gave the best effects, seen already after 1—2 min, and maximal after 6—8 min. With this concentration the response was kept up for a considerable time.

In all some 300 observations were made on about 25 eyes.

## Results.

### 1. The Effect of Alcohol on the Retinogram of Light- and Dark-Adapted Eyes.

Fig. 1 a shows the normal light-adapted electroretinogram to our standard stimulus. The slowly progressing effect of alcohol is illustrated in b and c. It consists of a diminution of the initial  $\alpha$ -wave, a rise of the  $b$ -wave and the positive phase of the response and a diminution of the off-effect. These effects appear with reliable regularity and are only modified by a gradual reduction of the whole response which, as a rule, is too slow to prevent the selective initial effect from dominating the picture of the first 10 min. after alcohol.

The diminution of the  $\alpha$ -wave is particularly well demonstrated in fig. 2 taken with greater amplification. It should be noted that the  $\alpha$ -wave falls at an increasingly slower rate and that, at the same time, the  $b$ -wave rises from a higher initial level.

The changes undergone by the electroretinogram of fig. 1 are, indeed, almost identical with those described by GRANIT and RIDDELL (1934) for dark-adaptation. In accordance with this

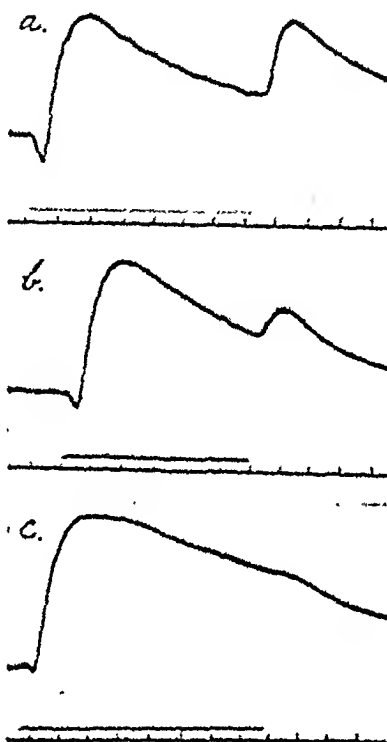


Fig. 1. Oscillograph records of the electroretinogram of a light-adapted frog. a, normal response; b, 3 min. and c, 8 min. after 10% alcohol. Time in this and the following figures in  $\frac{1}{3}$  sec. Light signal above time record.

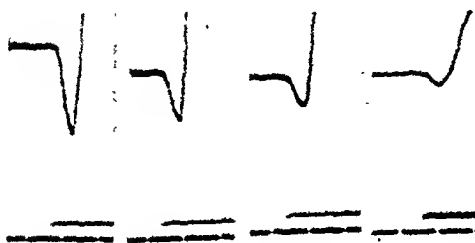


Fig. 2. Oscillograph records of the a-wave of a light-adapted eye. Normal a-wave to the left, the rest successive stages of the effect of alcohol.

fact our alcohol experiments with dark-adapted eyes led to similar but much smaller changes which therefore, so to speak, were in the direction of further emphasized dark-adaptation.

Without now entering into a discussion of further proofs for

arguments to be expanded below, let us nevertheless already at this stage throw a glance at Fig. 5 A. This figure shows that if the "normal" initial electroretinogram labelled 1 is subtracted from the curve 2, obtained after alcohol, there remains the negative component 3 which supposedly had been removed by the influence of alcohol. An alternative would be that alcohol merely had caused the positive component PII to rise. Further experiments have allowed a choice between these two possibilities.

## 2. The Influence of Alcohol on an Eye Treated with Potassium.

The easiest way of producing a relatively pure negative component PIII in the frog's eye is to treat it with potassium chloride (THERMAN, 1938). This was done with the normal electroretinogram 1 of fig. 3. The result was curve 2 of the same figure.

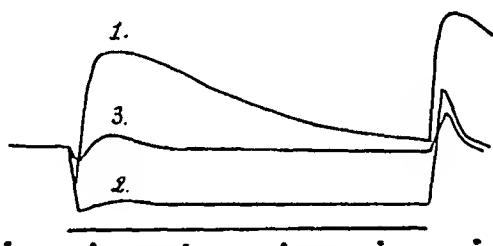


Fig. 3. Effect of alcohol on retinogram after 0.5 % potassium chloride. 1. normal electroretinogram; 2, 3 min. after potassium; 3, 6 min. after alcohol.

As can be seen the negative PIII is a direct continuation of the  $a$ -wave of the normal response.

When the eye had reached this stage it received a drop of 10 % alcohol in Ringer's solution. A few minutes afterwards the negative component had disappeared and the retinogram now looked like curve 3 of the same figure. Thus alcohol very effectively suppressed the negative component PIII of the largely negative response after potassium, as was to be expected from the behaviour of the  $a$ -wave.

Recently BERNHARD (1941) has found that the eye of the tortoise (*Testudo graeca*), at least in the autumn, may give a practically pure negative response which all tests show to be the negative component PIII in the practically isolated state. This negative response is also suppressed by alcohol (BERNHARD). Thus our conclusions based on potassium-treated eyes are fully supported by his results.

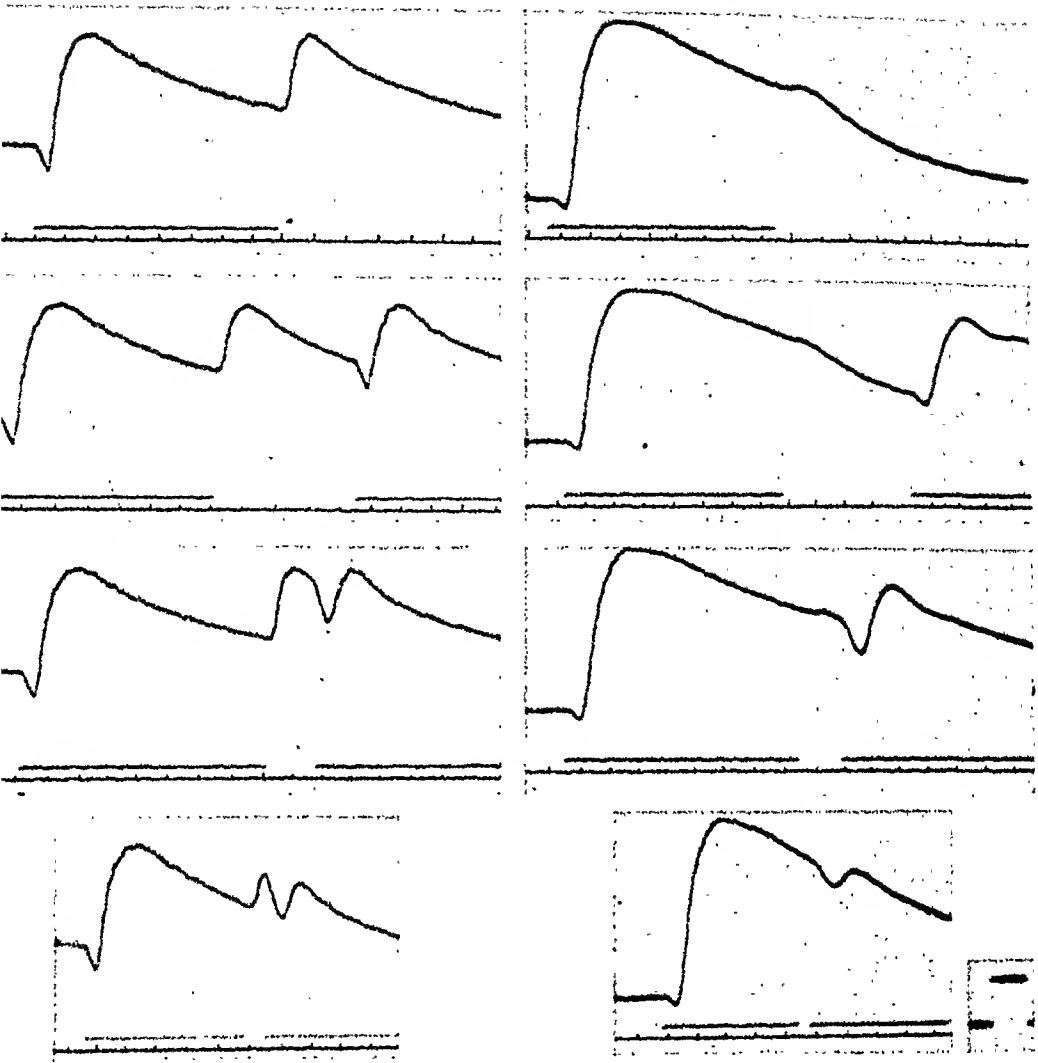


Fig. 4. Oscillograph records of electroretinograms showing re-illumination on the off-effect at different intervals. To the left normal controls, to the right same after alcohol. Note, light signal for re-illumination. Calibration to 0.1 mV.

### 3. The Effect of Alcohol on the Augmented Negative $\alpha$ -Waves Elicited by Light Superimposed on the Off-Effect.

GRANIT and RIDDELL (1934) found that re-illumination upon the off-effect at different intervals led to a series of  $\alpha$ -waves which increased in size towards the top of the off-effect thereafter again gradually to decrease towards normal values. This effect is shown in the three lower curves to the left of fig. 4 for

different gaps of darkness, the uppermost curve giving the normal off-effect control. They also showed that this effect implied a tendency towards re-attainment of the level of negative PIII reached towards the end of stimulation. Part of the off-effect represented the swing-back of PIII seen also after potassium in fig. 3 and summing algebraically with what remains of the slowly diminishing positive PII. Later GRANIT and THERMAN (1937) showed that the off-effect in addition contained an element of rising positive PII which could be removed by putting in a flash of light just *before cessation* of stimulation.

In view of the results mentioned it was of interest to try re-illumination on the off-effect of alcohol-treated eyes. This has been done in the series to the right in fig. 4, the reduction of the  $\alpha$ -waves obtained in this series clearly being in accordance with our earlier results and the results and deductions of GRANIT and RIDDELL (1934).

The diagram of fig. 5 A is based on an actual experiment. Curve 1 was the response before alcohol and curve 2 the response after alcohol. Subtraction of 1 from 2 gave the negative component 3, which accordingly had disappeared owing to the effect of alcohol.

In this diagram the off-effect deserves especial consideration. Curve  $a_1$  gives the level which the negative dips reached for different intervals of re-illumination on the normal off-effect, curve  $a_2$  the corresponding level during the maximum of the alcohol effect. It is again seen that re-illumination in the normal eye leads to much larger negative dips than after alcohol which in terms of the analysis of GRANIT and RIDDELL, means that at the end of illumination there is a much larger negative component to "re-establish" in the normal eye than in the alcohol-treated eye. An idea of the size of this negative component is given by the ordinates drawn from the top of the off-effect to  $a_1$  and  $a_2$  respectively. Again in the alcohol-treated eye there is more positivity left at "off". The amount of positivity is shown by the ordinates drawn from the base-line to  $a_1$  and  $a_2$  respectively. This is the fraction of the off-effect which cannot be removed by re-illumination but which, according to GRANIT and THERMAN (1937) largely can be made to disappear by a flash of a stronger light put in just before cessation of illumination. Thus our results are in complete accordance with the evidence for two components in the off-effect.

Fig. 5 B. Diagram, based on fig. 5 A, illustrating the part of the off-effect which can be referred to the return of the negative component PIII at cessation of illumination before (1) and after (2) alcohol.

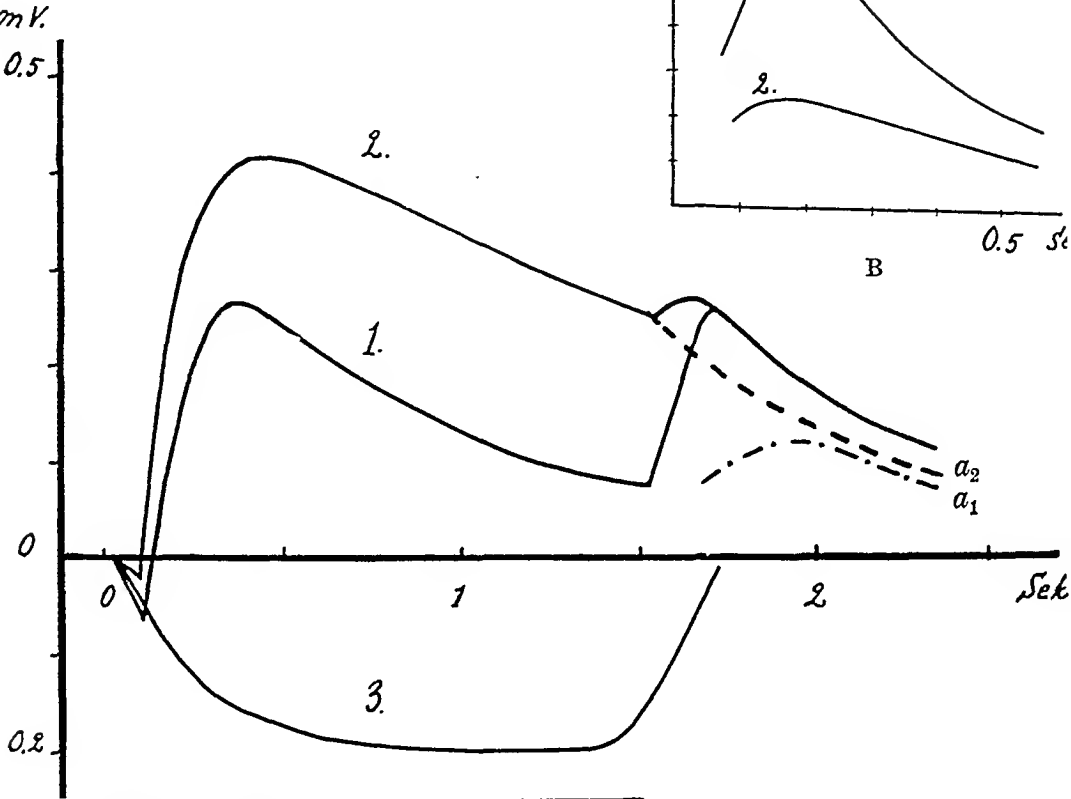
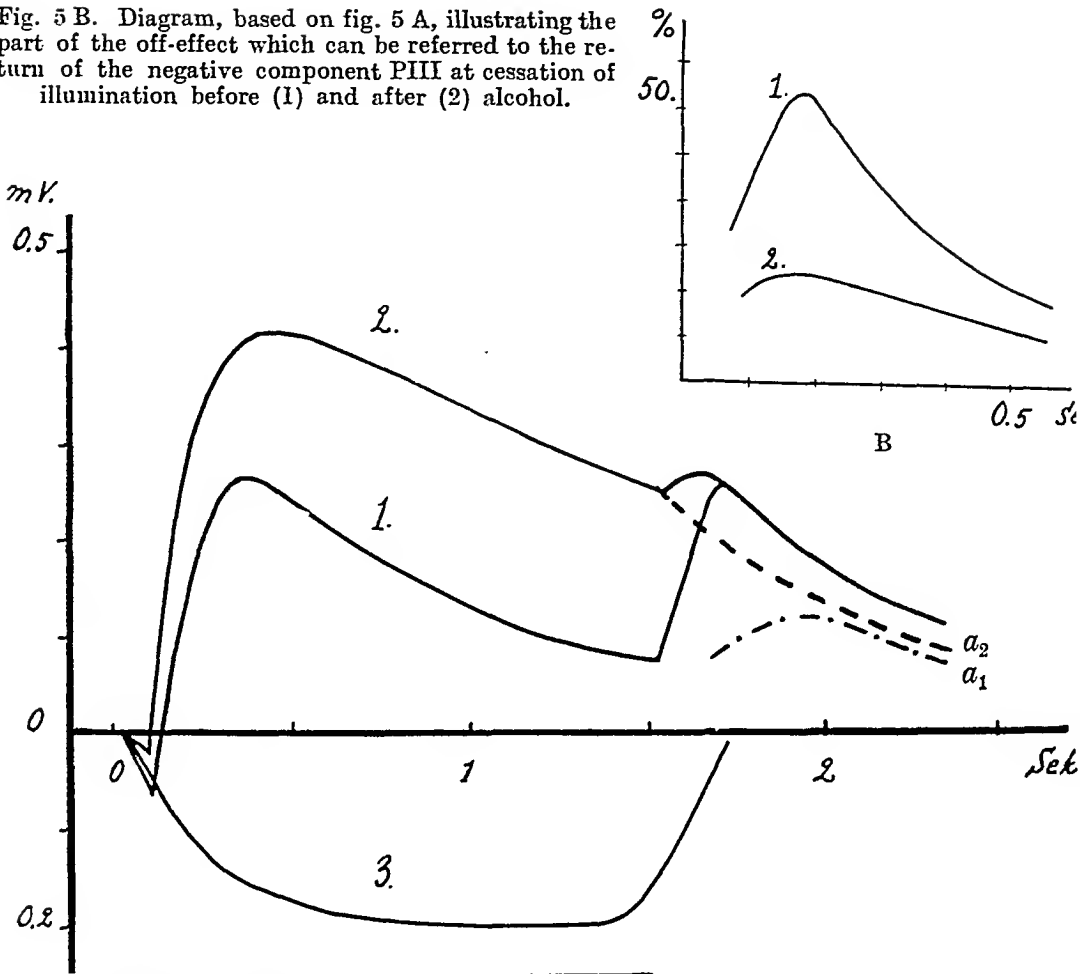


Fig. 5 A. Diagram representing data obtained in an experiment with re-illumination on the off-effect at different intervals. 1, normal initial retinogram; 2, after alcohol. Curves  $a_1$  and  $a_2$  show the level of the negative dips caused by re-illumination along the off-effect before ( $a_1$ ) and after ( $a_2$ ) alcohol. 3, the difference between 1 and 2 plotted downwards (see text).

Were one to draw the amount of swing-back of the off-effect which belongs to the negative component PIII alone, curves like those in fig. 5 B would be obtained. These are also results of the experiment illustrated in the diagram of fig. 5 A but the PIII-part of the normal and the post-alcohol off-effects are here given in per cent of the normal total off-effect. Thus the upper curve illustrates that about 65 % of the normal off-effect depended on the return of PIII whereas after alcohol only 25 % can have had this origin. Suppression of PIII with alcohol is thus relatively effective though far from complete.

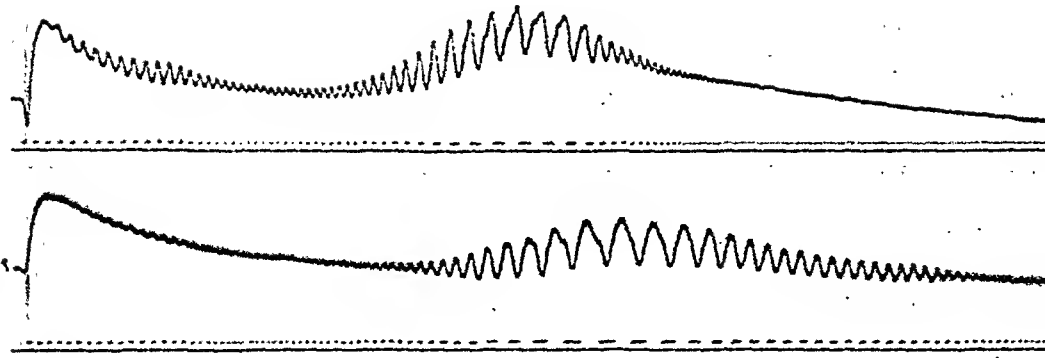


Fig. 6. The retinal response to intermittent light before (upper curve) and after (lower curve) alcohol.

Fairly complete removal of PII with potassium and suppression of PIII with alcohol (curve 3, fig. 3) actually gives an electroretinogram in complete accordance with the deductions made in this section.

#### 4. The Effect of Alcohol on the Electrical Response to Intermittent Light.

From the point of view of the similarity between the effects of alcohol and dark-adaptation it was of interest to study the reactions to intermittent light. We know that the perceived fusion frequency for flicker is lower in the dark-adapted eye. That the same holds good for the electrical response was shown by GRANIT and RIDDELL (1934) who also pointed out that the electroretinogram of the light-adapted eye swings up and down with the frequency of the intermittent stimulus, largely owing to the brisk reactivity of the negative component PIII.

Fig. 6 illustrates two retinograms to intermittent stimulation. The upper one is the normal light-adapted control, the lower one is a light-adapted eye after alcohol. An increased rate of stimulation induces a larger negative component which, as it were, holds the electrical response spring-like ready to rise as soon as stimulation becomes less frequent. In this respect the alcohol-treated eye with its lesser negative component is less active, as shown by the lower curve of the figure.

The fusion frequency after alcohol falls considerably; from 17 normally to 13 at the height of the alcohol-effect, in the experiment presented.



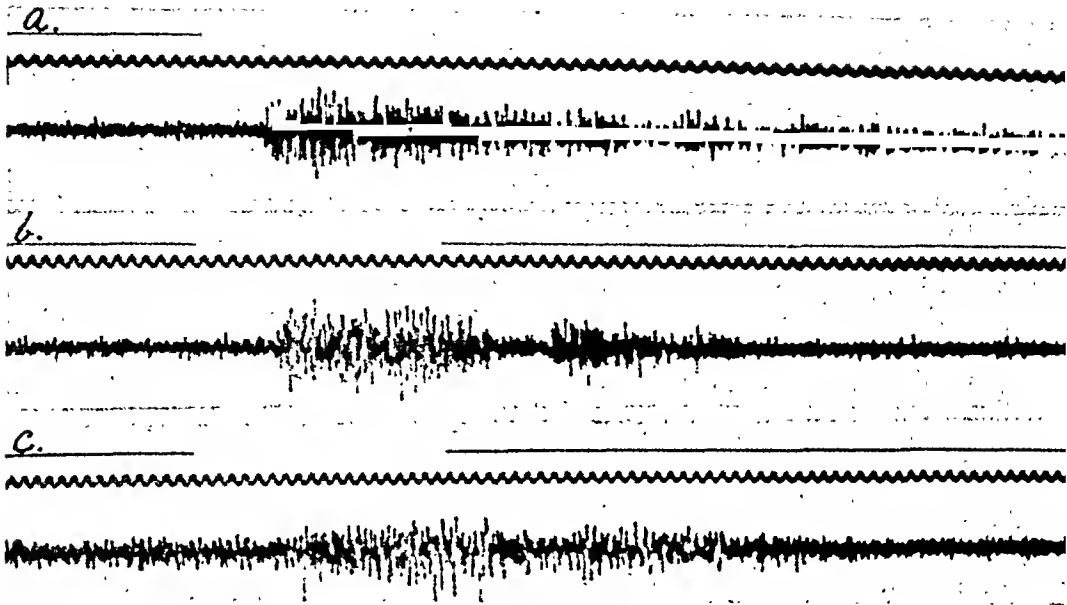


Fig. 7. Records from the optic nerve at "off". a, normal off-effect; b, and c, inhibition of the off-response caused by re-illumination before (b) and after (c) alcohol. Before cessation of illumination the eye had been illuminated for 1 sec  
Time in  $\frac{1}{8}$  sec.

These facts fall in line with the conclusions by GRANIT and RIDDELL (1934) to the effect that a large and active negative component is part and parcel of the process transforming the eye from the more slowly integrating apparatus of the dark-adapted state to the fast precision instrument of light-adaptation.

With central fixation and an area of about  $5^\circ$  we have also found that the perceived fusion frequency of our own eyes falls about 12 % when the blood alcohol reaches about 0.8 promille. Similar observations have been made by RUBINSTEIN and THERMAN (1935). Our present results do not exclude the possibility that the effect might have been retinal.

##### 5. The Effect of Alcohol on the Inhibition of the Off-Impulses in the Optic Nerve Caused by Re-Illumination.

As shown by GRANIT and THERMAN (1935) and by HARTLINE (1938) the negative  $\alpha$ -waves caused by re-illumination upon the off-effect are associated with inhibition of the impulses in the optic nerve. It was therefore of great interest to find out whether the diminished  $\alpha$ -waves after alcohol would coincide with a reduced inhibitory effect of re-illumination.

To this end we led off with silver-silverchloride cotton wick electrodes from whole nerve and studied the off-discharge during re-illumination. The normal off-effect is shown in the uppermost curve of fig. 7. The following curve b of the same figure illustrates the very effective inhibition beginning some 50 msec. after re-illumination. Finally the experiment was repeated after alcohol in curve c. There is now a considerable reduction of the typical inhibitory effect of re-illumination, visible despite the increased resting discharge caused by the drug.

To some extent the amount of reduction of inhibition after alcohol varies from experiment to experiment. Probably the main reason for this is the rotation of activity characterizing the discharge of the optic nerve (GRANIT and SVAETICHIN, 1939). Sometimes more, sometimes less inhibitable fibres happen to be active. It was our impression that the shorter the exposure before the off-effect, the more complete the effect of alcohol in suppressing inhibition. Whether this means that longer exposures strengthen inhibition or remove other fibres but the most inhibitable ones we do not know. On the other hand, inhibition may be very much suppressed also after long exposures.

### Discussion.

Whereas there can be no doubt about the fact that alcohol selectively suppresses the negative component PIII, it is more difficult to exclude a stimulating effect on PII. Such an effect, if there be one, is, however, of less immediate importance as it would only somewhat modify the quantitative aspects of our findings which in this case are not the most important ones.

Of greater importance is that we now possess a method of suppressing PIII, that the results obtained with this method in a rather striking manner support the conclusions reached, in papers referred to above, by other methods designed to bring order into this difficult subject, and, in particular, that suppression of PIII with alcohol runs parallel with a very marked diminution of inhibition in the optic nerve.

It is, indeed, a very significant general fact that whenever modifications of PIII are introduced which can be recorded in parallel with the discharge in the optic nerve, the results for the nerve turn out to be a modification of the off-effect and of inhibition. This has repeatedly been emphasized by GRANIT (see

*e. g.* summary 1938) who at the same time has been careful to avoid speaking of any causal relationship between the two. Nevertheless there must be *some* association between PIII and inhibition at least in the form that PIII is especially connected with the system that also is particularly likely to show up inhibitory phenomena. On the other hand, HARTLINE (1938a) has made the important discovery that in the eye of *Pecten* there are two types of cells, the one set going by light, the other by cessation of stimulation. The latter type is inhibited by light. It would therefore be premature to attempt to formulate anything more definite at this stage, the more so as the histology of the eye of *Pecten* deserves to be carefully studied.

From the point of view of alcoholology it is of great interest to find this substance selectively to suppress inhibition in a structure such as the retina which has the histological properties of a nervous centre. It may well have significant consequences for further work along these lines with other parts of the nervous system.

### Summary.

Electroretinograms and impulses in the optic nerve of frogs have been recorded with amplifier and cathode ray oscillograph.

The aim of the work was to study the effect of alcohol on the components of the electroretinogram and on the inhibition of the discharge in the optic nerve during re-illumination after cessation of stimulation.

The isolated potassium-resistant negative component PIII of the total electroretinogram is selectively suppressed by alcohol.

The negative component PIII is known to initiate the total electroretinogram with the fast, so-called *a*-wave. This wave is also selectively suppressed by alcohol.

The return of the negative component at cessation of illumination is known to be part of the large and fast off-effect. This part is also selectively suppressed by alcohol.

The negative component is known to cause particularly large *a*-waves during re-illumination on top of the off-effect. These *a*-waves are also suppressed by alcohol.

The negative *a*-waves caused by re-illumination on top of the off-effect are known to be associated with inhibition of the discharge of impulses in the optic nerve. This inhibitory effect is

First reprinting, 1964, Johnson Reprint Corporation

Printed in the United States of America

also largely suppressed when, owing to the influence of alcohol, the *a*-wave itself diminishes.

Thus alcohol has a selectively suppressing effect on the isolated negative component PIII of the retinal electrical response to light and the phases known to be expressions of this component as well as on inhibition in the optic nerve.

From the sensory point of view alcohol acts very much like dark adaptation. It reduces the fusion frequency to intermittent light and changes an electroretinogram of a light-adapted eye much as does dark-adaptation.

The expenses of this research were defrayed by grants from the Foundation Therese and Johan Anderssons Minne to the authors and from the Rockefeller foundation to the Neurophysiological Laboratory.

#### References.

- BERNHARD, C. G.: Unpublished observation, 1941.  
 GRANIT, R.: *J. Physiol.* 1933. 77. 207.  
 —, *Documenta Ophthalmologica* 1938. 1. 7.  
 —, and H. A. RIDDELL, *J. Physiol.* 1934. 81. 1.  
 —, and P. O. THERMAN, *J. Physiol.* 1934. 81. 47 P.  
 — —, *J. Physiol.* 1935. 83. 359.  
 — —, *J. Physiol.* 1937. 91. 127.  
 —, and G. SVAETICHIN, *Upsala Läk. fören. förh. N. F.* 1939. 45. 161.  
 HARTLINE, H. K.: *Amer. J. Physiol.* 1935. 113. 59.  
 —, *Amer. J. Physiol.* 1937. 119. 328.  
 —, *J. Cell. Comp. Physiol.* 1938 a. 11. 465.  
 —, *Amer. J. Physiol.* 1938 b. 121. 400.  
 —, *J. Opt. Soc. Amer.* 1940. 30. 239.  
 NIKIFOROWSKY, P. M.: *Z. Biol.* 1912. 57. 397.  
 RUBINSTEIN, B. and P. O. THERMAN, Unpublished observations 1935.  
 THERMAN, P. O.: *Acta Soc. Sci. Fenn. Nova Ser. B.* 1938. Tom II.  
 Nr. 1.  
 WALLER, A. D.: *Quart. J. exp. Physiol.* 1909. 2. 169.  
 ZEVI, M.: *Acta Soc. Sci. Fenn. Nova Ser. B.* 1939. Tom II. Nr. 4.
-

## Preparation and Purification of Thrombin.<sup>1</sup>

By

TAGE ASTRUP and SVEN DARLING.

(With 4 figures in the text.)

---

Since the discovery by ALEXANDER SCHMIDT of the blood-clotting enzyme thrombin, this substance has been the subject of several investigations. The knowledge of the nature of thrombin and its properties is significant for the understanding of the mechanism of the blood-clotting, and the conditions for obtaining real knowledge of the properties of thrombin is the availability of purified and potent preparations of the active substance. In most of the previous works on thrombin this condition has not been fulfilled. Usually clotting-times of a few hours were used, and a clotting-time of a few minutes' duration was regarded as exceptionally good results. With such weak preparations only very unreliable results of slight theoretical value are obtained, and opinions are still differing greatly as to the nature of thrombin and its mode of action in the blood-clotting process. Concerning these different opinions the reader is referred to the reviews of WÖHLISCH (1929), OPPENHEIMER (1926, 1939) and HOWELL (1935).

Potent preparations of thrombin yielding clotting-times of a few seconds have been described only by MELLANBY (1909, 1933), HOWELL (1910, 1913) BLEIBTREU (1926) and SEEGER, BRINKHOUS, SMITH and WARNER (1938).

The method of HOWELL is based on the extraction with 8 per cent sodium chloride solution of adsorbed thrombin from fibrin. It is very laborious and time-consuming to prepare thrombin according to the method of HOWELL; also the improved form of ROBERTS' (1935) yields products inferior to those obtained after the other methods mentioned.

---

<sup>1</sup> Received 7 January, 1941.

All the other methods are based on the condition found by J. MELLANBY (1909) that a fibrinogen preparation obtained by dilution of blood plasma with distilled water and acidification contains large amounts of prothrombin, which can be converted and purified to thrombin in various ways.

MELLANBY first worked with avian plasma, which is stable without addition of anticlotting substances. The plasma was diluted 20 times with distilled water and a few drops of 0.1 per cent acetic acid were added. The precipitated fibrinogen was resolved in physiological salt solution and activated by addition of calcium chloride and thrombokinase.

Later MELLANBY (1931, 1933), working with oxalated mammalian plasma, described a new method in which he first purified the prothrombin, which then was activated to thrombin, and yielded very potent preparations which could be purified further.

Another method of obtaining very potent thrombin preparations is given by SEEGER, BRINKHOUS, SMITH and WARNER (1938 a, b). These authors also purify the prothrombin after a method similar to that of MELLANBY, before activating it to thrombin.

BLEIBTREU (1926), however, employs the first method of MELLANBY and shows, that with this method it is possible also with mammalian plasma to obtain very potent preparations.

According to our preliminary experiments on preparation of thrombin, the original MELLANBY-method, as modified by BLEIBTREU, showed the most promising results. The best yield of active substance was obtained with this method. This experience, then, is in accordance with the experiments of ABDERHALDEN and BUADZE (1935).

Therefore systematic investigations based on the original method of MELLANBY were commenced in order to find the best conditions for the preparation of potent thrombin, and these studies resulted in the method newly published (ASTRUP and DARLING (1940)).

The present paper gives an account of the experiments on which this method is based, together with further purification and investigation of the thrombin prepared. The method was used in a previous work (ASTRUP (1938)) for the preparation of chicken thrombin from chicken plasma. For the preparation of thrombin in large quantities, however, it is necessary to use a more available plasma as starting material. Ox plasma is therefore used for this purpose.

## 1. Basis of the Method.

### Ox Plasma.

Ox blood is collected in glass jars containing 15 ml. of a 20 per cent potassium oxalate solution per liter of blood. This amount of oxalate is rather large, but it was found necessary for satisfactory fluidity of the large quantities of blood employed. The blood is passed through a metal sieve and centrifuged by a continual-working centrifuge of the oil or milk centrifuge type. There is obtained 50 to 55 per cent (by volume) of plasma, which usually is worked up immediately. Standing in the cold (0°) for 24 hours does not affect the plasma.

### Thrombokinase.

For activating, a thrombokinase prepared from fresh, ground beef lung was used. The lung was extracted with 2 parts (by weight) of 0.9 per cent NaCl solution for 4—5 hours with intermittent stirring. The mixture is passed through a double layer of gauze, and used as such immediately. To a solution of MELLANBY-fibrinogen prepared from 10—12 liters of ox plasma, an extract of 2 kg. of lung with  $\frac{1}{2}$  l. of salt solution is used.

### Measurement of Thrombin.

The potency of thrombin is measured by its capacity for clotting oxalated plasma. The clotting power, according to the literature, is directly proportional to the reciprocal of the clotting time, if not too weak solutions are used. If this is the case, it will be a simple matter to measure the potency of the thrombin solutions.

The determination of the clotting time takes place as follows: In tubes measuring 80 mm. in height and 15 mm. in diameter, 0.10 ml. thrombin solution is pipetted. 1.0 ml. ice cooled oxalated plasma is added by blowing out the pipette, so that a good mixing of the contents is obtained. The tube is placed quickly in a water-bath at 37°, and the clotting time is determined.

By dilution of a thrombin solution and determination of the clotting time for the resulting dilutions, the curve shown in Fig. 1 is obtained. The clotting time ( $t$ ) is measured in 1/100 min. and the concentration ( $c$ ) is given in per cent of the original solution.

From Fig. 1 it is seen that for clotting times not over 2 min. a straight line is obtained, and it was found possible to reproduce the values and use the method for standardisation.

Based on this, a *thrombin unit* (t. u.) is defined as the amount of active substance which will clot 1 ml. of oxalated plasma in 30 seconds (= 0.50 min.) at 37°.



The potency of a thrombin solution is given as the number of thrombin units per ml. (t. u. per ml.). If the clotting time is measured in 1/100 min. the potency is given through the following equation (1).

$$t. u. \text{ per ml.} = \frac{50}{0.10 \cdot t} = \frac{500}{t} \dots \dots \dots (1)$$

If the measurement is made in seconds, the equation (2) is applied:

$$t. u. \text{ per ml.} = \frac{30}{0.10 \cdot t} = \frac{300}{t} \dots \dots \dots (2)$$

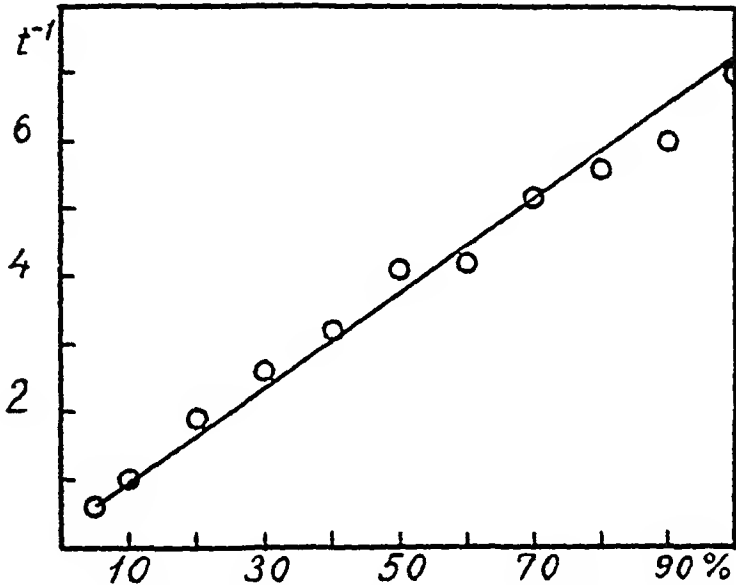


Fig. 1. Concentration of thrombin in per cent against the reciprocal of the clotting time.

For a dry thrombin preparation the potency found is converted to thrombin units per mg. of substance. For all the thrombin fractions the *activity* of the substance was then calculated as the amount of the thrombin units per mg. of nitrogen.

**Preparation of the Prothrombin Solution.**

The precipitation of the MELLANBY-fibrinogen is to be done in such a manner, that it contains the largest amount of prothrombin. As a rather large amount of oxalate is added, the plasma is diluted with 15 parts of distilled water instead of 10 parts as usual. MELLANBY (1931) describes a pH 5.3 as the best. BLEIBTREU (1926), however, uses a pH 6.2 for his precipitation. In preliminary experiments with varying pH values it was shown that the pH 5.3, as given by MELLANBY, gives the best results, and in further experiments the precipitation according to MELLANBY was compared with the precipitation of BLEIB-

TREU, and the results given in Table I were obtained, showing again that pH 5.3 gives the most potent thrombin.

Table I.

ml. AcOH 1 per cent	pH	t 1/100 min.	Thrombin units t. u. in 3 ml.
1.00	6.2	100	0.75
1.60	5.3	70	3.30

## 2. Preparation of Crude Thrombin (A).

The crude thrombin was then prepared as follows:

10 l. of plasma is diluted with 150 l. of distilled water and precipitated with acetic acid at pH 5.3, for which about 3 l. of 1 per cent acetic acid is used. The precipitation is most practically carried out in lots of 1 l. plasma, and the MELLANBY-fibrinogen is passed through a centrifuge after standing for about 10 min. Centrifugation of the whole amount takes about 1 hour, and the fibrinogen is then dissolved in 7.0 l. of 0.9 per cent NaCl at about 30°. 1.5 l. of kinase and 250 ml. of 1.5 per cent calcium chloride solution are added. The mixture clots in 1—3 min., and during this time it is stirred vigorously in order to obtain the fibrin in a thread-like form, which is easy to remove. The mixture stands 1 hour and is passed through a sieve. The solution contains about 8 t. u. per ml. and has a volume of about 9 l. Yield about 70,000 t. u.

This MELLANBY-solution is precipitated with one volume of acetone, and after standing to the next day it is centrifuged and the precipitate treated in a mortar with about 1.5 l. of acetone. After standing for 24 hours it is filtered on a Büchner funnel, and is again treated with 1 l. of acetone. After standing for some days, with intermittent stirring, it is filtered, treated with ether, and dried in the air. It is important that the treatment with acetone is done thoroughly, as a small rest of humidity renders the drying difficult, and thus reduces the activity.

The yield is about 60 g. of crude thrombin as a white powder. If 50 mg. of this is extracted with 10 ml. physiological NaCl, a solution containing about 4 t. u. per ml. results. The total is 48,000 t. u., i. e. about 70 per cent of the potency of the MELLANBY-solution. According to this measurement the potency of the dried crude thrombin is 800 t. u. per g. A total of about 1.5 kg. of thrombin A was prepared after this method.

## 3. Preparation of Purified Thrombin B.

As previous authors have obtained good results with reprecipitation with acetone, this method of purification was tried and was found to

give excellent results, as most of the impurities in thrombin A occurs in denatured and insoluble form. The purification then proceeds as follows: 40 g. of thrombin A are extracted for 6 hours at 0° with 800 ml. 0.9 per cent NaCl and a few drops of octyl alcohol. After centrifugation the precipitate is extracted again for 12 hours with 600 ml. NaCl solution. The two extractions yield 1,100 ml. of a solution Ea with a potency of 30—36 t. u. per ml. Total about 35,000 t. u.

To the solution Ea, 1 per cent acetic acid solution is added, until pH 5.5., and after centrifugation the clear solution is precipitated with 2 volumes of ice-cold acetone. After standing for 2 hours the precipitate is isolated by decantation and centrifuging, and is treated in a mortar with 200 ml. of acetone. After standing to the next day it is filtered on a Büchner funnel and treated with 200 ml. of absolute alcohol. After standing for additional 24 hours it is again filtered, treated with ether and dried in the air. The treatment with acetone and absolute alcohol must be done thoroughly. Yield about 2.5 g. of purified thrombin B containing about 10,000 t. u. per g. The yield is about 70—80 per cent of the contents of the thrombin A.

#### 4. Experiments with Thrombin B.

In the precipitation of thrombin B some denaturation occurs and 10—15 per cent of it is insoluble in distilled water and 0.9 per cent NaCl. From a solution of 1.15 g. thrombin B in 10 ml. of distilled water, the precipitation curve with ammonium sulfate after the method of SCHMITZ (1933 a) is obtained. This curve shows content of globulin and albumin as previously mentioned (ASTRUP and DARLING (1940)). An ammonium sulfate precipitation is therefore performed, and the fractions isolated and examined.

1.5 g. thrombin B is extracted for 2 hours with 100 ml. of distilled water. The solution is called Eb. 75 ml. of Eb is slowly precipitated by addition of 75 ml. saturated ammonium sulfate solution, and after 1 hour it is centrifuged and the precipitate dissolved in 50 ml. of distilled water. The solution is called G—I and contains globulins. The centrifugate containing the albumins is called A—I. Both solutions are dialyzed in a cellophane tube for 24 hours against running tap water. The resulting solution does not give any reaction with NESSLERS reagent. The potency is determined as usual.

The albumin solution (A—I) amounts to 250 ml. and contains 22 t. u. per ml. Total 5,500 t. u. The globulin solution (G—I) amounts to 75 ml. containing 51 t. u. per ml. Total 3,800 t. u. A total of 9,300 t. u. is thus obtained. The original solution Eb

amounted to 75 ml., containing 133 t. u. per ml. Total 10,000 t. u. Thus 93 per cent of the potency was found after the precipitation and the dialysis.

A complete fractionation was not obtained by such a single precipitation. The solutions A—I and G—I are therefore precipitated again with addition of 1 volume of saturated ammonium sulfate solution.

A—I only gives a small precipitate which is removed by centrifuging. The resulting clear solution is saturated with solid ammonium sulfate and the substance is isolated, dissolved in a little water and dialysed. The resulting solution is called A—II. 1 volume of saturated ammonium sulfate is added to G—I which is then centrifuged. The precipitate is dissolved in a little distilled water, dialysed, giving solution G—II. The centrifugate containing albumins from the G—I solution is also dialysed, and gives solution A—III.

By determination of the potency of these solutions the following results are obtained: 100 ml. of A—II containing 52 t. u. per ml., total 5,200 t. u. 240 ml. of A—III containing 10 t. u. per ml., total 2,400 t. u. 15.5 ml. of G—II containing 43 t. u. per ml., total about 700 t. u. Thus 8,300 t. u. of the original 9,300 t. u. was recovered. 7,600 t. u. was found in the albumin fractions, and only about 700 t. u., i. e. 9 per cent was found in the globulin fraction. A further reprecipitation of G—II yielded a practically inactive globulin fraction and an albumin fraction, which contained almost all the potency of the original G—II solution. The globulin fraction constituted only a small part of the total protein.

These experiments show that by precipitation with ammonium sulfate the purified thrombin B can be divided in a practically inactive globulin fraction and an albumin fraction containing the active substance. Curves for the ammonium sulfate precipitation of such fractions have been given previously (ASTRUP and DARLING (1940)).

The two albumin fractions A—II and A—III are now united and precipitated by saturation with solid ammonium sulfate, filtered on a Büchner funnel, dissolved in 20 ml. of distilled water, and dialysed as usual. The resulting solution A—IV is then precipitated with 2 volumes of acetone. After centrifugation, the precipitate is dissolved again in distilled water, and a small amount of insoluble material is removed by centrifugation. The solution is called A—V.

By determination of the yield of t. u. it was shown, that about 25 per cent of the thrombin was destroyed by the precipitation. This is contrary to the precipitation of the thrombin B, where similar experiments showed, that the precipitation as such gave a quantitative yield, and that difficulties were met only in the drying of the precipitated product. In several experiments the conditions for the precipitation were varied, but the loss still was 20—30 per cent. Difficulties in isolating thrombin in dry substance thus increase considerably with the purity of the product.

To follow the purification of the dissolved substance, nitrogen determinations were performed on the solutions by the micro-Kjeldahl method according to PARNAS and WAGNER. From determination of the potency and the nitrogen content, the activity was found as the amount of t. u. per mg. N.

The Ea extract of the crude thrombin contains 0.41 mg. N per ml. and has 30 t. u. per ml. which gives the activity 73 t. u. per mg. N.

The ammonium sulfate precipitated albumin fraction A—IV contains 0.24 mg. N per ml. and has 20 t. u. per ml. which gives 83 t. u. per mg. N.

The A—V solution of the acetone-precipitated albumin fraction contains 1.24 mg. N per ml. and 105 t. u. per ml. which gives 85 t. u. per mg. N.

It is obvious that only a small part of the impurities in the original Ea extract is removed, which is due to the small amount of globulin in Ea. It will be possible therefore to perform the ammonium sulfate precipitation directly on this extract.

## 5. Experiments with the Crude Thrombin Extract (Ea).

The curve for the precipitation with ammonium sulfate of an extract of 2 g. thrombin A with 25 ml. 0.9 per cent NaCl is determined as usual, and it deviates but very little from a curve for the Eb extract of thrombin B. Such a solution is then precipitated with ammonium sulfate.

2 g. of thrombin A are extracted with 40 ml. of 0.9 per cent NaCl and 1 drop of octyl alcohol for 24 hours. After centrifugation, the precipitate is extracted again with 15 ml. of salt solution and the two extracts are united (Ea). Volume 50 ml. To 40 ml. are added, slowly and during stirring, 40 ml. saturated ammonium

sulfate solution. After standing for 1 hour it is centrifuged and the globulin dissolved in 10 ml. of distilled water and dialysed (G—I). The albumin fraction is also dialysed (A—I).

The potency of the crude Ea extract is 36 t. u. per ml. with a volume of 40 ml. Total 1,440 t. u. The potency of A—I is 7.2 t. u. per ml. and volume 150 ml. Total 1,080 t. u. The potency of G—I is 25 t. u. per ml., volume 12.5 ml. Total 310 t. u. Of the original 1,440 t. u. 1,390 t. u. was found, i. e. 97 per cent. A—I and G—I are precipitated again by 0.5 saturation. In A—I only a small precipitate was found, which after centrifugation was dissolved in water and dialysed (G—II). The centrifugate was filtered as usual after saturation with ammonium sulfate, the substance was dissolved in water and dialysed (A—II).

In the same manner G—I was fractioned in a globulin solution G—III and an albumin solution A—III. The results of these experiments are seen from Table II.

Table II.

Solution.	T. u. per ml.	mg. N per ml.	T. u. per mg. N'
Ea	36	0.580	62
A-I	7.2	0.090	80
A-II	30	0.360	83
A-III	2.5	0.053	47
G-I	25	0.560	45
G-II	0	—	0
G-III	10	0.490	20

From Table II it is seen, that fractionating the crude Ea extract gives just as active solutions as fractionating the Eb extract of the purified thrombin. Here the active substance follows the albumin fraction too, which gives an ammonium precipitation curve similar to the one already mentioned, showing only traces of globulins.

## 6. Precipitation of the Albumin Fraction.

The albumin fraction served as starting material for further purification of the thrombin, and was best prepared as follows: 40 g. of thrombin A is extracted as described in part 3. To the

VOL. 2. INDEX.

Page. Fasc. 1. (25. IV. 1941.)

1	Y. ZOTTERMAN. . . . .
10	Selective Suppression with Ethylalcohol of Inhibition in the Optic Nerve and of the Negative Component P III of the Electrorétinogram. By C. G. BERNHARD and C. R. SKOGLUND. . . . .
22	Preparation and Purification of Thrombin. By TAGE ASTRUP and SVEN DARLING. . . . .
41	Emulsion, Darstellung und Reinigung. Von PEAR EDMAN und ERIK FORPES. . . . .
51	Potassium Exchange in the Stimulated Muscle. By L. HAHN and G. HEVESY. . . . .
64	A New Physical Stroke-Volume Formula and its Applications. By Über die Verteilung des Kupfers zwischen Plasma und roten Blutkörperchen bei extremen physiologischen Verschiebungen im Cu-Gehalt des Blutes. Von CARL G. HOLMBERG. . . . .
71	The Liberation of Histamine from the Skin during Anaphylactic Reaction in the Guinea Pig. By NILS EKMERLIN, G. S. KARLSON and KARIN LINDSTRÖM. . . . .
78	Weitere Untersuchungen über die Karbindikationsmethode als Funktionsprobe der Bluthirnschranke (BHS) im Tierexperiment. Von TORE BROMAN. . . . .
83	

Fasc. 2. (14. VI. 1941.)

93	Isolation of Colour-Sensitive Elements in a Mammalian Retina. By RAAGAR GRANIT. . . . .
110	Blood Histamine in Reactive Hyperaemia and in Muscle Tetanus. By N. EKMERLIN, G. KARLSON and F. WICKSELL. . . . .
123	Histamine in Plasma and Methods of its Estimation. By N. EKMERLIN, G. KARLSON and F. WICKSELL. . . . .
143	Die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebzellen in vitro. Von ALBERT FISCHER. . . . .

resulting solution Ea is added one volume (about 1,100 ml.) of saturated ammonium sulfate solution in a thin jet under vigorous stirring. The mixture is filtered on a fluted filter by simultaneous stirring, and yields the globulin fraction G—I and the albumin fraction A—I.

G—I is dissolved in 15 ml. of distilled water. 1 volume of saturated ammonium sulfate is added, and the resulting globulin fraction G—II is isolated. The filtrate (A—II) is united with A—I and saturated with solid ammonium sulfate. After standing to the next day at 0°, it is filtered and the albumin fraction A—III dissolved in a little water (about 50 ml.). The solution is dialysed as usual, and then against distilled water. The resulting fraction has an activity about 100 t. u. per mg N. The yield of active substance isolated as a dialysed albumin fraction A—III is 60—70 per cent. If the first precipitation is carried out with solid ammonium sulfate instead of a saturated solution, the yield is only about 30 per cent. The potency of the globulin fraction is increased and the total yield is about the same, giving a total yield of about 70 per cent. Thus about 30 per cent is lost during the operations; experiments have shown, that this loss is due to the protracted dialysis of the large lots of fluids, as the thrombin is slowly passing through the cellophane membrane. This partially dialysability of the thrombin is in accordance with the experience of other authors. A part of the loss may also be due to a partial inactivation of the thrombin. The dialysing process must therefore be of as short duration as possible.

## 7. Purification of the Albumin Fraction A—III.

Preliminary investigation of the albumin A—III showed, that an addition of acetate buffer with pH 4.4 gives a precipitate, which after solution in distilled water and neutralization with NaOH contains about 70 per cent of the amount of thrombin, whereas the rest of it remains in the mother liquor. In order to give a good yield of active precipitate, the solution must be almost free from salts and other electrolytes.

Systematic investigation further showed, that too large amounts of buffer solutions decrease the yield of active substance. It was found best to use a concentration of 0.02 — 0.04-m.

To 5 ml. of a dialysed albumin fraction A—III, containing a total of 350 t. u., is added 0.20 ml. of 1-m acetate buffer. After



standing for 1 hour the mixtures are centrifuged and the precipitate of each is then dissolved in distilled water under neutralization with 0.05-n NaOH and made up to 5 ml. The potency and activity of the resulting dilutions are determined as usual. The results are shown in Table III.

Table III.

pH	Precipitate t. u.	Supernatant t. u.	Total yield t. u.	Activity of precipitate t.u. per mg. N	Activity of supernatant t.u. per mg. N
5.0	0	350	350	0	79
4.4	250	101	351	301	21
4.1	188	97	285	172	25
3.8	147	96	243	110	25
3.5	83	60	143	63	16

At pH 5.0, no precipitate is found. At pH 4.4, 72 per cent of the active substance is precipitated, and both the activity and the total yield are best here. In the more acid solutions an inactivation of the thrombin takes place.

According to this method larger lots of buffer-precipitated thrombin was prepared. The activity of the fractions obtained varied from 300—815 t. u. per mg. N. These fractions thus are 3—8 times as potent as the albumin fractions.

## 8. Investigations of the Buffer-Precipitated Thrombin (C).

Of the buffer precipitated thrombin C prepared as described ammonium precipitation curves are made as usual. From 40 g. of thrombin A a dialysed fraction A—III is made, precipitated with buffer and dissolved in water to a volume of 5.0 ml. The solution contains 750 t. u. per ml. and 0.920 mg. N per ml. The activity is thus 815 t. u. per mg. N. For obtaining the curves 0.20 ml. solution to every 10 ml. ammonium sulfate solution is used. The curve is shown in Fig. 2 as Curve 1; it deviates a little from the curve for the fraction A—III. The maximum of precipitation is reached already at 65 per cent saturation, and the curve starts to rise at a rather low saturation. The substance seems not to be pure, and further fractionation by salt precipitation seems not promising.

A curve for the fraction in the mother liquor from the buffer precipitation is also obtained. This fraction contains 56 t. u. per ml. and 1.80 mg. N per ml. giving the activity 31 t. u. per mg. N. The curve is shown in Fig. 2 as Curve 2. The curve is similar

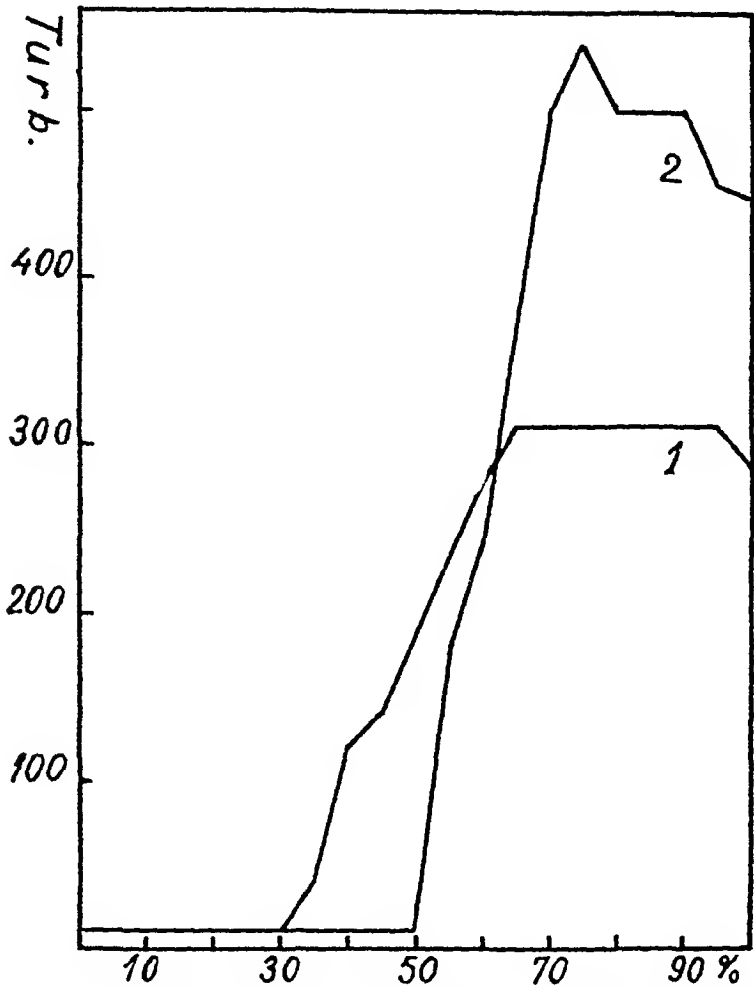


Fig. 2. Precipitation with ammonium sulfate. 1. Thrombin (solution of precipitate). 2. Supernatant solution.

to the curve for the albumin fraction A—III. The greater part of this albumin fraction therefore consists of impurities of albumin character.

On a solution of thrombin C (purified by buffer precipitation) an orientating investigation in the electrophoresis apparatus of TISELIUS (1937) was carried out.

To 8 ml. of a thrombin solution 15 ml. of a 0.02-m phosphate

buffer pH 7.2 was added, and the mixture was dialysed against the buffer. The electrophoresis was carried out with a field of 6.55 volt per cm. Two components were found, a fast-moving with a mobility of  $12.7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$ , and a more slowly wandering component with a mobility of  $7.0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$ . The rapid component contained the active substance.

The original solution contained 356 t. u. per ml. and 0.590 mg. N per ml. giving the activity 603 t. u. per mg. N. The rapid component from the electrophoresis was isolated and showed a content of 129 t. u. per ml. and 0.097 mg. N per ml., giving the activity 1,330 t. u. per mg. N.

### 9. Investigation of the Impurities.

Both the precipitation curve for the thrombin C and the experiments with electrophoresis show that this fraction is impure. It is possible that a part of these impurities comes from the kinase used in the activation of prothrombin to thrombin, and this possibility was therefore investigated.

To 1.0 l. of kinase, prepared as described above, 1.0 l. of acetone is added. This amount of kinase corresponds to 40 g. of thrombin A, which is the amount used in the further purification. After centrifugating the precipitate is treated in the same manner as in preparation of thrombin A. The yield of dry substance was 20.5 g. This shows that about half of the substance isolated as thrombin A is impurities from the kinase.

15. g. of the dry substance are extracted with 200 ml. of 0.9 per cent NaCl. After standing to the next day at  $0^\circ$  it is centrifuged. 100 ml. of the fluid are precipitated with 100 ml. of saturated ammonium sulfate. The globulin fraction is isolated and the filtrate is saturated with solid ammonium sulfate. After filtration the albumin fraction is dissolved in a little water and dialysed as usual. The solution is precipitated with acetate buffer pH 4.4 as in the precipitation of thrombin C. A precipitate of the same appearance as thrombin C is obtained. It is dissolved in distilled water by addition of a little 0.05-n NaOH to neutral reaction. The solution does not clot oxalated plasma and contains therefore no thrombin. An ammonium sulfate precipitation curve, (Fig. 3), shows that the solution contains both globulin and albumin. Its appearance shows similarities with a curve from thrombin C, (Fig. 2, Curve 1).

Thus it is shown that constituents of the kinase used for activation are contained in the buffer precipitated thrombin C.

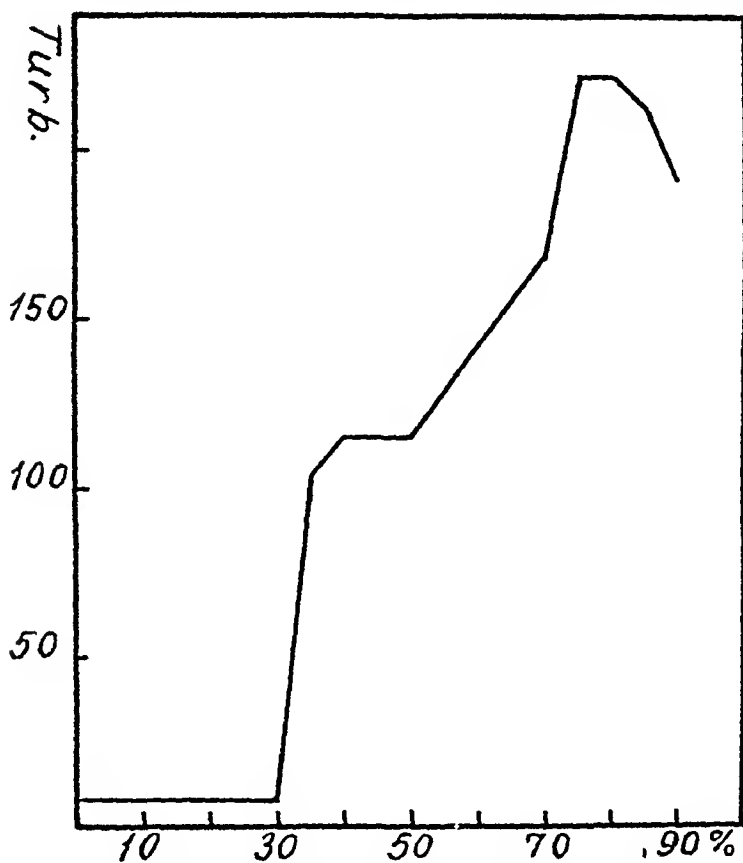


Fig. 5. Precipitation with ammonium sulfate. Components from the thrombinase.

## 10. The Phosphorus Content of the Thrombin.

The P content of the thrombin is of considerable interest, as several authors are of the opinion, that thrombin is a combination between prothrombin and a clotting active, phosphorus-containing, lipid. But, some of the authors, working with the more potent thrombin preparations, did not find phosphorus.

The different thrombin preparations were therefore analysed for phosphorus according to FISKE and SUBBAROW (1925). The measurements were carried out with a Pulfrich photometer (Zeiss) according to TROELL (1931).

By our P analysis we often obtained a green color of the solutions instead of a pure blue. The cause of this complication was found

to lie in the ashing operations. As soon as the nitric acid used for the ashing was replaced by potassium sulfate and hydrogen peroxide (Perhydrol, Merck) this complication did not occur. The method is therefore carried out as follows: The substance is placed in a 30 ml. destruction flask, and 0.70 ml. of  $H_2SO_4$  and a little potassium sulfate (0.1—0.15 g.) is added. As soon as the water is evaporated, one drop of Perhydrol is added 3 times at intervals of 5 minutes, and the mixture is boiled for 30 minutes. The content is poured into a 50 ml. volumetric flask. Water and reagents (molybdate sol. III) are added. As comparison standard 5 ml. of a solution containing 0.08 mg. of P in 5-n  $H_2SO_4$  prepared according to FISKE and SUBBAROW is used.

For analyses of dry substances, 50 mg. is dissolved in 7.0 ml.  $H_2SO_4$  by careful heating. After cooling, water is added to 10 ml. Of this solution an amount of 1 ml. is used for both N and P analyses. For N analysis, further 0.8 ml. of  $H_2SO_4$  is added.

The results are as follows: In a  $\bar{E}a$  extract of the crude thrombin A containing 22 t. u. per ml. a total P of 0.075 mg. P per ml. is found. Inorganic P is found to be 0.075 mg. P per ml.

For a dialysed albumin fraction A—III containing about 200 t. u. per ml. a total of 0.003 mg. P per ml. is found after dialysing for 24 hours. The same amount was found for inorganic P. After dialysing for 3 days the P content (total and inorganic) amounted to 0.001 mg. P per ml.

In a buffer precipitated fraction C containing 750 t. u. per ml. and having the activity 815 t. u. per mg. N a P content of 0.000 mg. P per ml. is found.

Thus it is found, that the most active thrombin preparations do not contain phosphorus.

## 11. Heat Inactivation of Thrombin.

The stability of thrombin against heating is investigated. Several tubes containing a thrombin solution are heated to different temperatures and after varying periods of time the samples are cooled in ice and the potency is determined. The potency is expressed in per cent of the potency of the original solution. The experiments give the curves shown in Fig. 4. According to the experiments, thrombin shows great lability towards heating. Already after 5 minutes' heating to  $56^\circ$ , practically all the thrombin is inactivated. The two different curves at  $37^\circ$  represent

experiments which were obtained several times. It was not possible to show, why some of the experiments gave a small inactivation, while others were not doing so. It is possible that the inactivation is due to an absorption to denaturing proteins followed by a partial resolution of the thrombin. The thrombin solutions heated to  $56^{\circ}$  showed a rather great opalescence.

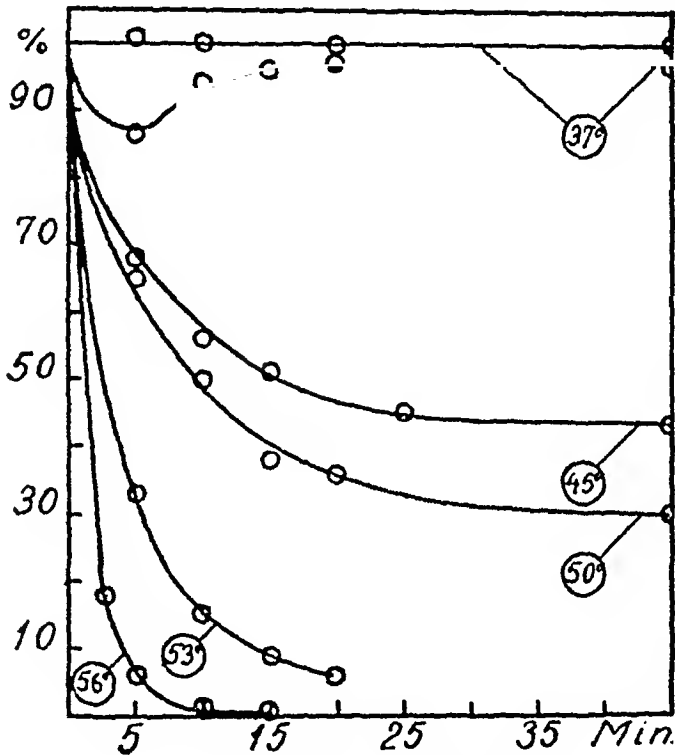


Fig. 4. Heat inactivation of thrombin.

## 12. Discussion of the Results.

A thorough discussion of the results obtained is not to be undertaken, as it will be sufficient to refer to the experimental results.

As mentioned before (ASTRUP and DARLING (1940)), the thrombin seems to be connected with proteins of the albumin types. This is interesting, as the precursor of the thrombin, prothrombin, is stated to be found in the globulin fraction, CEKADA (1926) and SCHMITZ (1933 b). The buffer precipitated albumin fraction has been shown not to be the pure thrombin, and it is therefore not yet possible to establish all the properties of the pure thrombin. It is also interesting that the albumin fraction can be further

fractionated by precipitation with acid, which shows properties similar to denaturated albumin.

The most active thrombin fractions were found to be free from phosphorus. In a solution containing 750 t. u. per ml. and 0.920 mg. N per ml. it was not found possible to show the presence of 0.001 mg. P per ml. The phosphorus content was thus smaller than 0.1 per cent of the nitrogen content, and the activity of the thrombin fraction was greater than 750,000 t. u. per mg. P. These results show that phosphorus is not likely to be an ingredient of the thrombin. Thrombin thus cannot be a compound between a P-containing lipid and prothrombin. Experiments have also shown, that extraction of dry thrombin preparations with lipid solvents (chloroform, benzol etc.) does not decrease the activity of the preparations. If, however, solutions of thrombin are shaken with those solvents a decrease of the activity is found, which probably is due to denaturation of proteins.

The heat inactivation curves show that thrombin is to a great extent labile towards increasing temperatures. A difference between a salt containing solution and a salt free solution was not found, which is contrary to the results of HOWELL (1935).

The most active thrombin fraction was isolated by electrophoresis and showed an activity of 1,330 t. u. per mg. N. The most active precipitate produced in any amount, was prepared by buffer precipitation and showed an activity of 815 t. u. per mg. N, which corresponds to about 120 t. u. per mg. dry substance. For comparison with thrombin preparations of the above mentioned authors, the following result may be cited: Of the preparation by ROBERTS (1935) according to the method of HOWELL, 2 drops of a 0.7 per cent solution clot 3 drops oxalated plasma in 30 sec. This corresponds to 1.5 t. u. per ml. and 0.2 t. u. per mg. substance. It is thus a very weak preparation.

0.02 ml. of the first thrombin of MELLANBY (1909), clotted 1.0 ml. fibrinogen in 120 sec. which corresponds to about 12.5 t. u. per ml. 0.01 mg. of MELLANBY'S most potent thrombin (1933) clotted 1 ml. of oxalated plasma in 30 sec. corresponding to about 100 t. u. per mg. substance. These preparations then correspond in potency to our thrombin C.

BLEIBTREU (1926) prepared a thrombin from which one part of a 0.05 per cent solution clotted one part of oxalated plasma in 10 sec. This corresponds to 3 t. u. per ml. and 6 t. u. per mg. substance. The substance is similar to our thrombin B.

According to SEEGER, BRINKHOUS, SMITH and WARNER (1938 a) 0.0018 mg. of their most potent thrombin will clot 1 ml. oxalated plasma in 30 sec. The substance contains then about 550 of our thrombin units per mg., which gives a potency of about 5 times our most potent thrombin C. A thrombin unit (Iowa unit), according to the mentioned authors, is the amount of active substance which will clot 1 ml. of a fibrinogen solution in 15 sec. This should be equal to about two of our units. This seems not to be in accordance with the same authors' statement (1939), that 100 of their units will clot only 50 ml. of blood in 16 sec. The proportion between the Iowa unit and our unit has therefore not yet been definitely settled.

Further investigations are in progress. Two papers on thrombin appeared too late to receive attention in this work, viz. HUDEMANN (1940) and SEEGER (1940).

### Summary.

1. A modified MELLANBY—BLEIBTREU method for preparing large quantities of a potent thrombin has been described.
2. The thrombin has been purified by fractionation with ammonium sulfate, and precipitation at pH 4.4 in salt-free solution.
3. A thrombin unit (t. u.) is defined, and the measurement described.
4. The most potent fraction obtained by precipitation contained 815 t. u. per mg. N. This could be increased by electrophoresis to 1,330 t. u. per mg. N.
5. The most potent thrombin preparations do not contain phosphorus.
6. The heat inactivation of thrombin has been studied.

Thanks are due to Løvens kemiske Fabrik, Copenhagen, for grants during this work.

### References.

- ABDERHALDEN, E. and S. BUADZE: *Fermentforschung*, 1935, 14, 215.  
ASTRUP, T.: *Enzymologia*, 1938, 5, 119.  
— and S. DARLING: *J. Biol. Chem.* 1940, 133, 761.  
BLEIBTREU, M.: *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1926, 213, 642.



- CEKADA, E. B.: Amer. J. Physiol. 1926, 78, 512.
- FISKE, C. H. and Y. SUBBAROW: J. Biol. Chem. 1925, 66, 375.
- HOWELL, W. H.: Amer. J. Physiol. 1910, 26, 453. and 1913, 32 264.  
—, Physiol. Rev. 1935, 15, 435.
- HUDEMANN: Kolloidzshr. 1940, 92, 189.
- MELLANBY, J.: J. Physiol. 1909, 38, 28.  
—, Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B. 1931, 107, 271.  
—, Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B. 1933, 113, 93.
- OPPENHEIMER, C.: Die Fermente, Hauptwerk 1926 and Supplement 1936.
- ROBERTS, A. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 1935, 32, 606.
- SCHMITZ, A.: Hoppe-Seyl. Z. 1933 (a) 221, 197.  
—, Hoppe-Seyl. Z. 1933 (b) 222, 155.
- SEEGERS, W. H., H. P. SMITH, E. D. WARNER and K. M. BRINKHOUS:  
J. Biol. Chem. 1938 (a), 123, 751.  
—, K. M. BRINKHOUS, H. P. SMITH and E. D. WARNER: J. Biol. Chem. 1938 (b), 126, 91.  
—, J. Biol. Chem. 1940. 136. 103.
- TEORELL, T.: Biochem. Z. 1931, 230, 1.
- TISELIUS, A.: Biochem. J. 1937, 31, 1464.  
—, Trans. Faraday Soc. 1937, 33, 524.
- WARNER, E. D., K. M. BRINKHOUS, W. H. SEEGERS and H. P. SMITH:  
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 1939, 41, 655.
- WÖHLISCH, E.: Ergebn. Physiol. 1929, 28, 443.
-

## Fasc. 3—4. (30. IX. 1941.)

Titrimetric Determination of the Carbon Dioxide Content of Biological Fluids. By R. WENNESLAND .....	189
Titrimetric Determination of the Carbon Monoxide Binding Capacity of Blood. By R. WENNESLAND .....	198
The Rate of Protein Renewal in Mice and Rats Studied by Means of Heavy Hydrogen. By HANS H. USSING .....	209
The Fate in Metabolism of Deuterium Introduced in some Amino Acids by Heating with D <sub>2</sub> O and H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . By HANS H. USSING ..	222
On the Activity and Structure of Vitamin K. By BERTIL SJÖGREN and CARL GUSTAV SUNDBERG .....	227
Über die Bedeutung der Lungen als Blutdepot beim Menschen. Von TORGNY SJÖSTRAND .....	231
A Method of Determining the Quantity of Heat Evolved on the Complex Resistance in an Element of the Blood-Flowmeter (•Thermo-Stromuhr) after Rein. By I. K. TYEDE-JACOBSEN ..	249
Factors Influencing Renin Pressor Action. By U. S. v. EULER and TORGNY SJÖSTRAND .....	261
Vasokonstriktorische Wirkungen von Nierenextrakten und ihre Beziehungen zu Renin und Vasotouin. Von U. S. v. EULER und TORGNY SJÖSTRAND .....	274
Post-tetanic Action Potentials in Mammalian Muscle. By C. G. BERNHARD, U. S. v. EULER and C. R. SKOGLUND .....	284
Evipan and the Parasympathetic Nervous System. By NILS ERMELIN .....	289
A Geiger Counter Arrangement Applied to Measurements of Radioactive Indicators in Biological Research. By HILDE LEVI .	311
The Oxygen Consumption of the Isolated Perfused Cat's Brain. By TORE BROMAN and DORA JACOBSON .....	324
Über zentrale Kurarewirkungen. Von U. S. v. EULER und H. WAHLUND .....	327
A Relation between Rod and Cone Substances, Based on Scotopic and photopic Spectra of <i>Cyprinus</i> , <i>Tinca</i> , <i>Anguilla</i> and <i>Testudo</i> . By RAGNAR GRANIT .....	334
Potassium Interchange in Yeast Cells. By GEORGE HEVESY and NIELS NIELSEN .....	347
On the Determination of the Vitamin B <sub>1</sub> Content of Urine. A modification of the thiochrome method. By K. WASSMANN .....	355
Untersuchungen über die Permeabilität der roten Blutkörperchen bei normalen Menschen. Von S. L. ØRSKOV .....	366
Zur Histaminbestimmung in Gewebsextrakten. Von ERIC ÅKERBLOM .....	378

---

Supplementum III. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung der Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Keto-Glutarsäure und Citronensäure sowie einiger anderer mit deren Umsatz nahe verknüpfter Verbindungen im Harn. Von FRANZ-EDUARD KRUSIUS.

Aus der chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts,  
Stockholm, Schweden.

## Emulsin, Darstellung und Reinigung.<sup>1</sup>

Von

PEHR EDMAN und ERIK JORPES.

(Mit 1 Figur im Texte.)

---

Wertvolle Beiträge zur Frage nach der Wirkungsgruppe der als Enzyme und Hormone aktiven Eiweissstoffe sind in der letzten Zeit erhalten worden. In einigen Oxydationsenzymen hat sich ein Alloxazin als der eigentliche Wasserstoffüberträger erwiesen. Andererseits hat man bei einer ganzen Reihe von krystallinischen Enzymen wie bei der Urease, dem Pepsin und den Enzymen der Trypsingruppe wie auch bei den Hormonen Insulin und Sekretin keine von der gewöhnlichen Eiweissstruktur abweichende Sonderheit entdecken können.

Bezüglich der kohlehydratspaltenden Enzyme vermutete man, sowohl was die Saccharase der Hefe als auch was die  $\beta$ -Glukosidase des Emulsins betrifft, eine prostetische Gruppe von Kohlehydratnatur. Die Wirkung der Saccharase wird, wie MYRBÄCK im Jahre 1926 nachgewiesen hat, durch verschiedene Amine gehemmt. Dies könnte durch eine Reaktion analog der Bildung Schiffscher Basen von Aldehyden und aromatischen Aminen erklärt werden, vorausgesetzt dass die aktive Gruppe von Aldehydnatur ist. Die Resistenz dieser Gruppe gegen HCN schliesst jedoch diese Möglichkeit aus. LETTRÉ hat im Jahre 1937 der Vermutung Ausdruck gegeben, dass sterisch isomere Kohlehydrate Träger der sterisch spezifischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukosidasewirkung wären. Er spricht sogar von freien Aldehydgruppen als Wirkungsträger, eine Auffassung der sich weder MYRBÄCK noch HELFERICH angeschlossen haben.

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 16. Januar 1941.

HELPERICH und seine Mitarbeiter haben sich mit dieser Frage eingehend beschäftigt (HELPERICH, RICHTER und GÜNTHER 1937, HELPERICH und MITTAG 1938). Sie haben darauf Nachdruck gelegt, dass die reinsten Emulsinpräparaten etwa 10 Prozent Zucker enthalten. In einer späteren Arbeit von HELPERICH und PIGMAN (1939) wird jedoch konstatiert, dass der Kohlehydratgehalt bei der Reinigung nicht erhöht sondern, im Gegenteil, erniedrigt wird. Obgleich der  $\beta$ -Glukosidase-Wert des Süßmandel-Emulsins von 1.1 bis auf 14 (15.6) erhöht wurde, hielt sich der Zuckergehalt auf 3—5 Prozent. In einem Präparate mit dem  $\beta$ -Glukosidase-Wert 14 war der kolorimetrisch bestimmte Zuckergehalt nur 3.7 Prozent. Die Verfasser sagen dass »die Hypothese, dass Zucker einen wesentlichen Bestandteil des Fermentes ausmacht, kann weiter als Grundlage für künftige Diskussionen dienen«.

Der Kohlehydratgehalt des Emulsins ist auch für die Beurteilung der Frage, ob es überhaupt Proteine gibt, die eine Zuckerkomponente enthalten, von Interesse. Eine ganze Reihe von Proteinen hat man durch Krystallisation zuckerfrei erhalten. Nur das Ovalbumin mit 1.8 Prozent Zucker trotz wiederholter Umkrystallisation macht hiervon eine Ausnahme (NEUBERGER). Die  $\beta$ -Glukosidase enthält wie die meisten amorphen Proteine 3—5 Prozent Zucker. Die Ergebnisse der letzten Zeit haben wohl gezeigt, dass es physiologisch hochaktive Stoffe gibt, die einen sehr hohen Gehalt an Zucker haben, wie die Enterokinase (KUNITZ 1939) mit 20 Prozent Zucker und die gonadotrope Substanz des Harns mit 18 Prozent Kohlehydrat (WILSON, BACHMANN und GURIN 1940). Es ist jedoch sehr fraglich ob der Zuckergehalt der Emulsinpräparate etwas mit der Wirkung zu tun hat. Weil dieses Enzym der klassische Representant dieser Gruppe ist, der schon von LIEBIG und WÖHLER im Jahre 1837 beschrieben wurde und es überdies verhältnismässig leicht zugänglich ist, haben wir uns der Frage über die Darstellung und Reinigung des Emulsins gewidmet und dazu einige Eigenschaften des Enzyms untersucht.

## Die Darstellungsmethode.

### Die Extraktion.

Als Ausgangsmaterial wurden entweder Süßmandel oder Placenta amygdalae amarae verwendet. Die Süßmandeln wurden gemahlen, gepresst, noehmals gemahlen und mit Benzin (1 l.

pro kg) extrahiert. Aus 20 kg Süssmandeln erhielt man 10 kg Trockenpulver.

2 kg feingemahlene Placenta amygdalae amarae oder Trockenpulver der entfetteten Süssmandeln werden während einer Stunde bei Zimmertemperatur in der Schüttelmaschine in einer 10 l. Flasche mit 5 l. 0.1 N Ammoniak (40 ml konz. Ammoniak in 5 l.) extrahiert. Der Rückstand wird dann in einer grossen Zentrifuge separiert und nochmals während einer Stunde mit 2 l. 0.01 N Ammoniak extrahiert. Zu den vereinigten Extrakten setzt man 1.1 l. 0.5 N Essigsäure (Verdünnung des Eisessigs 1 : 32). Nach Aufbewahrung während 24 Stunden bei + 3°, wobei sich eine dicke Masse absetzt, wird dekantiert oder zentrifugiert. Zu der essigsauren Lösung werden pro Liter 330 g Ammoniumsulfat gesetzt. Der Niederschlag wird separiert und in der kleinstmöglichen Menge, etwa 600 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wird in Gegenwart von Toluol während 24 Stunden im Cellophanschlauch gegen Leitungswasser dialysiert und danach mittels Destillation auf 300 ml eingedampft. Nach Dialysieren gegen dest. Wasser wird die Lösung in der Kälte aufbewahrt. Der entstandene Niederschlag wird entfernt und die Mutterlauge nochmals eingedampft, dialysiert und gekühlt. Zuletzt bekommt man 100—150 ml einer etwa 10 prozentiger Lösung, aus welcher durch Konzentrieren und Kühlen kein weiterer Niederschlag zu erhalten ist.

Bei diesem Verfahren geht sehr wenig von der  $\beta$ -Glukosidase-Wirkung verloren. In einer grösseren Präparation von 8 kg Placenta ausgehend, betrug der Verlust nur 10 Prozent. Diese konzentrierten Rohextrakte enthielten pro kg Trockenpulver der Süssmandeln etwa 80,000 Einheiten nach der im Folgenden verwendeten Bezeichnung. 1 mg enthielt etwa 10 Einheiten. Zwei genau kontrollierte Präparationen ergaben dasselbe Resultat.

#### Fraktionieren mit Aceton.

Das Fraktionieren mit Neutralsalzen gab in der oben beschriebenen Lösung kein befriedigendes Resultat. Es konnte zuerst nach Fraktionieren mit Aceton vorgenommen werden.

Die Reaktion der Lösung wurde auf pH 4.6—5.0 eingestellt und Aceton zugesetzt zu 25, 37, 44, 48 und 52 Vol. Proz. oder 25 ml Aceton zu 75 ml Lösung u. s. w. Der Niederschlag wurde nach Aufbewahren bei Zimmertemperatur während einer Stunde durch Zentrifugieren entfernt.

Die Verteilung der Aktivität war in den verschiedenen Präparationen keine einheitliche. Nur die bei 25 und 52 Vol.-Proz.-igen Aceton erhaltenen Niederschläge waren inaktiv. In den meisten Präparationen war der bei 48 Vol.-Proz. erhaltene Niederschlag qualitativ und quantitativ besser als die anderen. In einigen Präparationen dagegen wurden bis zu 50 Proz. der Aktivität in der 37 Vol.-Proz.-igen Fraktion gefunden. Die bei 37, 44 und 48 Vol.-Proz. Aceton erhaltenen Niederschläge mussten darum jeder für sich auf Trockensubstanz und Aktivität untersucht werden.

Das Fraktionieren mit Aceton hat seine Nachteile. Ein bedeutender Teil der Aktivität geht dabei verloren, gewöhnlich 30 Proc. bisweilen sogar 50 Proz. ohne dass man die Aktivität in der Mutterlauge wiederfinden kann. Durch Aceton wurde die Aktivität der Präparate bis zu 15—45 Einheiten pro mg erhöht je nach der Verteilung in den verschiedenen Fraktionen.

#### Fraktionieren mit Ammoniumsulfat.

Die mit Aceton erhaltenen Niederschläge wurden noch feucht in Wasser gelöst und die Lösung einige Stunden in der Kälte in Cellophanschläuchen gegen dest. Wasser dialysiert. Sie wurden auf eine Konzentration von 1 Proz. verdünnt und auf pH 5 eingestellt. Danach wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Niederschläge wurden bei 50 prozentiger Sättigung, (1 Vol. gesätt. Ammoniumsulfatlösung) bei 55 Proz. (1.2 Vol. ges. Lösung) und bei 61 Proz. (1.6 Vol. ges. Lösung) erhalten. Die bei 55 und 61 prozentiger Sättigung erhaltenen, vereinigten Niederschläge enthielten in zwei kleineren Präparationen 90 Proz. der  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität und in einer grösseren Präparation 75 Proz. Die bei 61 prozentiger Sättigung erhaltene Fraktion enthielt gewöhnlich die grösste Aktivität und war bisweilen sogar doppelt so stark wie die unmittelbar vorhergehende. Reinheit der besten Fraktionen 120—150 (200) Einheiten pro mg.

Bisweilen wird eine bedeutende Menge der Aktivität schon bei 50 prozentiger Sättigung ausgefällt.

#### Weitere Reinigung mit Alkohol.

Die mit Ammoniumsulfat erhaltenen Niederschläge liessen sich nach Dialyse gegen dest. Wasser mit Ethylalkohol gut reinigen, was durch folgendes Beispiel demonstriert wird.

20 ml. Lösung mit 5.2 mg. Trockensubstanz pro ml und 132 Einheiten pro mg. (Im Ganzen  $20 \times 5.2 \times 132$  Einh. = 13,700 Einh.) pH 7.2 Zimmertemperatur.

Tabelle.

Fraktion	Vol.-Proz. 95 Proz. Alkohol	Trocken- substanz	Emulsin- Einheiten	Aktivität Einh. pro mg	Kohlehydrat- gehalt Proz. (Dische)
I . . . . .	27	14.1	2,200	156	3.9
II . . . . .	33	10.9	2,500	230	6.2
III . . . . .	43	13.4	3,300	247	5.3
IV . . . . .	50	6.3	1,100	175	4.8
V . . . . .	60	6.7	0	—	—
Mutterlauge		37.5	—	—	—
			9,100		

## Kataphoreseversuche.

Es wäre zu erwarten, dass Kataphoreseversuche mit den gereinigten Präparaten zur Klärung verschiedener Fragen beitragen sollten. Zuerst wurde der isoelektrische Punkt bestimmt. Weiters könnte man erwarten, eine weitere Reinigung der Präparate oder eine Separierung der Zuckerkomponente von dem Eiweiss zu erreichen. Diese zwei letzteren Ziele wurden leider nicht erreicht. Die Versuche wurden mit Präparaten ausgeführt, von denen 1 mg in 15 Minuten 150 mg. Glukose aus Salicin abspalteten. In dem untersuchten pH-Gebiete, 3.78—8.72, schied sich jedesmal eine gelbgefärbte, anodische wandernde Komponente aus, wonach die nunmehr farblose Lösung jedoch noch immer die volle  $\beta$ -Glukosidasewirkung hatte.

Die kataphoretisch bestimmte isoelektrische Punkt liegt wie aus der Fig. 1 hervorgeht bei pH 5.7—5.8.

Die Hauptmenge der Substanz gab ein deutlich wahrnehmbares Band, wozu regelmässig noch zwei schwächere Bänder auftraten. Die Präparate zeigten sich, wie zu erwarten war, nicht homogen.

Der Kohlehydratgehalt wurde nach TILLMANS—PHILIPPI mit Orcin-Schwefelsäure bestimmt und die Farbenintensität mit derselben einer Mischung von zwei Teilen Mannose und einem Teile Galaktose verglichen.

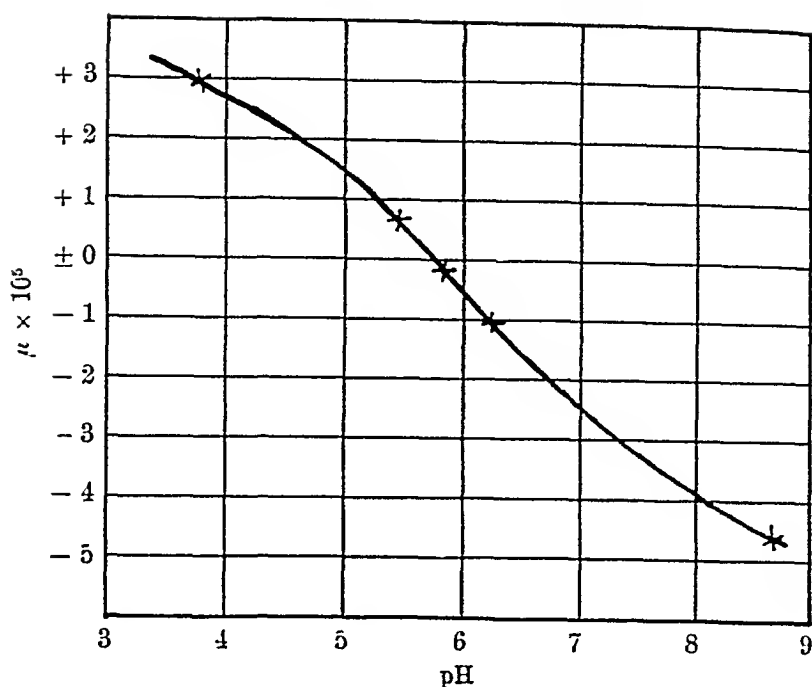


Fig. 1.

*Kataphoreseversuch bei pH 3.73.*Spezif. Leitfähigkeit =  $1.93 \times 10^{-3}$ 

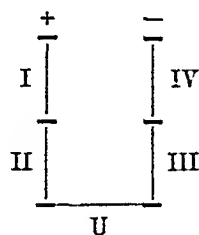
Ionenstärke = 0.1

Stromstärke = 20 Milliamp.

Zeit = 2 Stunden = 7,200 Sek.

Konzentration der Emulsionslösung etwa 1.5 Prozent

Temperatur = 0° C.



	Stickstoff mg/ml	Stickstoff Prozent	Kohlhydrat mg/ml als 2 Mannose: 1 Gal- laktose berech- net (Orcin- Schwefelsäure)	Kohle- hydrat Prozent	$\beta$ -Glukosi- dasewir- kung Ein- heiten/ml	Aktivität Prozent
U . .	1.95	—	0.96	—	2,180	—
III . .	2.17	—	0.98	—	2,220	—
IV . .	1.29	66	0.58	60	1,200	55
II . .	0.56	29	0.27	28	680	31
I . . .	0	—	0	—	0	—



*Kataphoreseversuch bei pH 8.72.*

Spezif. Leitfähigkeit	= $3.25 \times 10^{-3}$
Ionenstärke	= 0.1
Stromstärke	= 20 Milliamp.
Zeit	= 3 Stunden = 7,200 Sek.
Konzentration der Emulsinlösung	etwa 1.5 Prozent
Temperatur	= 0° C.

	Stickstoff mg/ml	Stickstoff Procent	Kohlehydrat mg/ml (Orcin- Schwefelsäure)	Kohle- hydrat Prozent	$\beta$ -glukosi- dasewir- kung Ein- heiten/ml	Aktivität Prozent
U . . .	2.1				2,240	
I . . .	1.27	61	0.85	70	1,380	62
II . . .	2.32		1.22		2,320	
III . . .	0.80	33	0.32	26	728	32.5
IV . . .	0		0		0	

In diesen beiden Kataphorese-Versuchen ist bei einer so weit verschiedenen Azidität wie pH 3.78 und 8.72 sowohl die  $\beta$ -Glukosidasewirkung wie auch die Kohlehydratkomponente mit dem Protein gegangen. Die Werte stimmen so genau überein wie man es überhaupt bei Verwendung dieser Bestimmungsmethoden erwarten kann. Eine Reinigung der Präparate wurde durch die Kataphoreseversuche nicht erreicht.

**Bestimmung der  $\beta$ -d-Glukosidasewirkung.**

Die  $\beta$ -d-Glukosidasewirkung der Salicinspaltung wurde reduktometrisch gemessen. Die Aktivität wurde aus verschiedenen Gründen weder in der üblichen Sal. f. von v. EULER noch in dem  $\beta$ -Glukosidase-Wert von WILLSTÄTTER und HELFERICH ausgedrückt, sondern in mg Glukose, die unter bestimmten Bedingungen bei 30° C in 15 Minuten von 1 mg Emulsinpräparat aus einem Überschuss von Salicin freigemacht werden. Der Reduktionswert wurde nach SHAFFER-SOMOGYI (1933) bestimmt. Es wurde eine vollkommene Proportionalität mit der verwendeten Emulsinmenge erhalten.

*Technik:* Ein Reagenzglas, 2  $\times$  20 ml mit 9.5 ml 3 prozentiger Salicinlösung (30 g Salicin + 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 l., pH auf 4.4 eingestellt) wird in ein Wasserbad von 30° C gestellt. Nach 10

Min. wird mit einer Vollpipette 0.5 ml der Emulsinlösung eingeblasen. Mit derselben Pipette werden unmittelbar nach Mischung 0.5 ml entnommen (die Kontrolle) und nach genau 15 Minuten weitere 0.5 ml. Die Proben werden in 5 ml SHAFFER-SOMOGYI Reagenz eingeblasen, wobei die Spaltung aufhört. Zur Reduktion wurde während 20 Minuten gekocht. Titration mit 0.01 N Thio-sulfatlösung.

Der Enzymlösung wurden jedesmal drei Konzentrationen in den Proportionen 1 : 2 : 4 entnommen. Es wird gute Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reduktionswert erhalten vorausgesetzt, dass die Zuckermenge in 0.5 ml der Salicinlösung nach 15 Minuten von 0.2 aufwärts bis zu 0.8 mg Glukose beträgt. Der gefundene Glukosewert wird mit 20 multipliziert. Bei der Berechnung ist zu beachten, dass nur 0.5 ml der Enzymlösung der Salicinlösung (9.5 ml) zugesetzt wurde.

Wir haben diese Methode sehr vorteilhaft gefunden. Mit dieser kann die Aktivität von mehreren Präparaten schnell bestimmt werden, ohne dass man mehrstündige Ablesungen abwarten muss, wie dies bei der polarimetrischen Methode erforderlich ist.

Die nach 5 bzw. 10 Minuten erhaltenen Reduktionswerte liessen sich nicht so gut verwenden wie die nach 15 Minuten erhaltenen Werte.

#### Der Kohlehydratkomponent.

In den Kataphoreseversuchen, wo nur relative Werte gewünscht sind, wurde die Orcin-Schwefelsäure-Methode nach TILLMANS-PHILIPPI verwendet. Zur Schätzung der qualitativen Natur und der Menge des Zuckers wurde die Carbazolreaktion von DISCHE nach GURIN und HOOD (1939) benutzt. Es zeigte sich, dass Glukose mit dem Hohen Quotienten  $\frac{E\ 530}{E\ 430}$  von 4.4 nicht in Frage kommen

kann. Der in den gereinigten Emulsinpräparaten gefundene Quotient, etwa 1.10—1.20, entsprach demjenigen einer Mischung von Mannose-Galaktose in den Gewichtsmengen 2 : 1 oder möglicherweise 3 : 1. In einem Präparate mit 193 Einheiten pro mg. wurden mit dieser Methode 4.8 Prozent Kohlehydrat gefunden und in zwei anderen Präparaten (Tabelle 2) mit 230 bzw. 247 Einheiten pro mg. 6.2 bzw. 5.3 Prozent Zucker.

### Zusammenfassung.

Hochgereinigte Emulsinpräparate wurden aus Mandeln hergestellt. Nach Extraktion des entfetteten Materials mit 0.1 N Ammoniaklösung wurden Verunreinigungen durch Aufbewahren in der Kälte von der angesäuerten Lösung entfernt. Nach Ausfällen mit Ammoniumsulfat und Entfernen des Salzes durch Dialyse wurde die Lösung wiederholt konzentriert, dialysiert und gekühlt, bis kein Niederschlag mehr erhalten wurde. Die weitere Reinigung geschah durch Fraktionieren mit Aceton, Ammoniumsulfat und Ethylalkohol. Metallsalze und Adsorptionsreagenzien wurden vermieden.

Die reinsten Präparate hatten einen  $\beta$ -Glukosidase-Wert von etwa 18—20.<sup>1</sup> Ein mg spaltete in Gegenwart von einem Überschuss von Salicin bei 30° C in 15 Minuten etwa 250 mg Glukose ab.

Die Präparate waren noch nicht rein. Sie zeigten auch eine sehr starke Phosphatasewirkung.

Der kataphoretisch bestimmte isoelektrische Punkt der  $\beta$ -Glukosidase liegt bei pH 5.7—5.8.

Im Kataphorese-Versuche wanderte die Aktivität in dem pH-Gebiete 3.78—8.72 mit dem Eiweiss. Dasselbe war der Fall mit der Kohlehydratkomponente, die etwa 5—6 Prozent der Trockensubstanz ausmacht und wahrscheinlich aus Mannose und Galaktose (2 : 1 (?)) besteht. Der Kohlehydratgehalt wird bei der Reinigung stets erniedrigt.

Herrn Cand. med. K. A. J. WRETLIND danken wir für Mitwirkung bei der Analyse.

Diese Untersuchung wurde durch Mittel aus der Stiftung »Therese och Johan Anderssons Minne« ausgeführt.

### Literatur.

- GURIN, S., and D. B. HOOD, J. biol. Chem. 1939. 131. 211.  
HELPERICH, B., W. RICHTER und S. GÜNTHER, Säch. Akad. Wiss. Mat. phys. Klasse 1937. 89. 385.  
HELPERICH, B., und R. MITTAG, Ber. dtsch. chem. Ges. 1938. 71. 1585.  
HELPERICH, B., und W. W. PIGMAN, Z. physiol. Chem. 1939. 259. 253.  
KUNTZ, M., J. gen. Physiol. 1939. 22. 447.

<sup>1</sup> Die Aktivität wurde mit derjenigen eines Emulsinpräparates verglichen, welches uns freundlichst von Herrn Professor Helferich gegeben wurde.

- LETTRE, H., *Z. angew. Chem.* 1937. 50. 581.  
LIEBIG, J., und F. WÖHLER, *Ann. Chim. (Phys.)* 1837. 22. 1.  
MYRBÄCK, K., *Z. physiol. Chem.* 1926. 158. 160.  
NEUBERGER, A., *Biochem. J.* 1938. 32. 1435.  
SHAFFER, P. A., und M. SOMOGYI, *J. biol. Chem.* 1933. 100. 695.  
TISELIUS, A., *Trans. Faraday Soc.* 1937. 33. 524.  
WILSON, D. W., C. BACHMANN and S. GURIN, *J. biol. Chem.* 1940.  
133. 467.
-

Supplementum IV. Untersuchungen über die Bildung und den Abbau der Citronensäure im tierischen Gewebe. Von NILLO HALLMAN.

Supplementum V. Studien über Umsatz und Wirkungen der Bernsteinsäure in Vivo. Von SVEN FORSSMAN.

Supplementum VI. Component potentials of the submaxillary gland electrocardiogram. By A. LANGENSKIÖLD.

Supplementum VII. Studien über den nahrungsphysiologischen Wert der Weizenkleie unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung der Erhitzung. Von STIG BORGSTRÖM.

Supplementum VIII. Verdoperoxidase. Von KJELL AGNER.

---

## Potassium Exchange in the Stimulated Muscle.<sup>1</sup>

By

L. HAHN and G. HEVESY.

---

In a previous paper (HEVESY and HAHN, 1941) the problem of the exchangeability of the potassium in the resting muscle was discussed. We saw that a very rapid replacement of a minor part of the cellular potassium by plasma (extracellular) potassium takes place, followed by a fairly rapid exchange of an appreciable part of the potassium present. This process takes about a day and is followed by a very slow further exchange, only. The larger part of the cellular potassium was found not to have participated in the exchange process and we had to conclude that this part does not interchange or interchange only at a very slow rate with the plasma potassium. The exchangeability of a part of the potassium of the resting muscle can only be ascertained by using an isotopic indicator, not so the loss of potassium by the stimulated muscle. As found by numerous experimenters, the muscle loses potassium when stimulated and recovers more or less its initial potassium content under rest. The loss of potassium by the muscle in these experiments makes up only a fraction of the potassium present in the muscle and the problem is raised whether ultimately all the muscle potassium exchanges with plasma potassium under muscular work or whether only a certain fraction of the potassium present in the muscle which is playing the game. Before describing the experiments carried out with labelled potassium in order to answer this question we wish to give a short survey of the work previously done on the loss of potassium by the stimulated muscle.

---

<sup>1</sup> Received 20 January, 1941.

## Former Work on Potassium Change in Muscle during Activity.

Perfused frog muscles were first investigated. No loss of potassium was found except in the case of stimulation to exhaustion (MITCHELL and WILSON, 1927). Other experimentors (ERNST and Co-workers, 1928, 1929, 1934) found a loss of potassium by direct stimulation, but not by indirect stimulation; however, when the permeability was increased by high potassium content of the perfusate, there was a loss of potassium even with indirect stimulation. An increased potassium content was found in human blood (EWIG and WIENER, 1928) after exercise and in cats blood (BAETJER, 1935) after exhausting stimulation. The heart muscle loses potassium during ventricular fibrillation (KEHAR and HOOKER, 1935).

An extended study of the loss of potassium by the stimulated muscle was carried out by FENN and his collaborators. They analyzed muscle and blood and could, thus, state quantitative figures for the loss of potassium by the stimulated muscle. Indirect stimulation for 30 minutes led to a decrease amounting to 0.6 per cent of the potassium content of the frog muscle, direct stimulation to a loss of 6 per cent. In rat muscles prolonged stimulation through the nerve caused a loss of about 14 per cent of the potassium of the muscle, a loss which was compensated by a nearly corresponding influx of sodium. These changes were found to be reversible during 1 to 3 hours of recovery. (FENN and COBB, 1934, 1935, 1936, and THALER, 1936). Stimulated cat muscles were found to lose somewhat less potassium than rat muscles; also in these experiments the loss of potassium was balanced by a gain of sodium by the muscles (FENN, COBB, MANERY and BLOOR, 1938, MALORNY and NETTER 1937).

The amount of potassium liberated by the stimulated muscles is larger than can be found in the blood; thus, during activity of sufficient degree of severity, potassium moves from the active muscles into some inactive parts of the body. To test the rôle of the inactive muscles as a depot for potassium during exercise, experiments were tried in which the muscles of both the hind legs were stimulated (FENN, 1939). The resting muscles of the forelegs were sampled on one side before stimulation and on the other side after stimulation, both the sides being analyzed for potassium. The changes in potassium content in the foreleg muscle which can

be produced by stimulation of the hind leg muscle were found to be insignificant. From this result follows that no significant increase in the potassium concentration of the resting muscle takes place when the potassium content of the plasma is increased. When the experiment was, however, repeated on eviscerated cats, a significant increase in the potassium content of the resting muscles was found. These findings suggest the interpretation that the rate of penetration of the additional plasma potassium into the muscle cells is much slower than into some of the organs removed when eviscerating the cats and, therefore, as long as these organs are present the resting muscle does not take a significant part in the removal of the excess potassium poured by the stimulated muscle into the circulation.

### Uptake of Labelled Potassium by the Stimulated Muscle.

As mentioned above, the cells of the stimulated muscle lose a minor part of their potassium content. In a previous paper, we saw that a part of the potassium present in the muscle cells interchanges rapidly with potassium ions present in the plasma resp. in the extracellular volume. The question therefore comes up if the loss of potassium by the working muscle is to be interpreted as due to the fact that in the working muscle, in the time unit, the same amount of potassium moves from the plasma into the cells as in the resting muscle, while, the amount moving in opposite direction being larger in the working muscle, a net loss of potassium by the muscle cells arises. In this case the amount of  $^{42}\text{K}$  penetrating into the muscle cells should be the same in the resting and in the stimulated muscle. An alternative possibility is that in the working muscle the cell wall gets more permeable and, in spite of a net potassium loss by the cells, more labelled potassium penetrates into the cells than in the case of the resting muscle. We tested this point by administering labelled potassium as chloride by subcutaneous injection to six rats (3.1 mgm. potassium to each); three rats had to perform heavy muscular work for 30 minutes, three were kept as controls. The first mentioned rats had to swim for 30 minutes. The swimming started 12 minutes after the administration of  $^{42}\text{K}$ . Two rats were almost exhausted by the intense swimming and by the strenuous efforts to escape from the spacious swimming pool, the third rat (Nr. VI) had to be assisted in the last phase of the swimming. The rats were all



killed almost simultaneously and the activity of plasma and gastrocnemius was measured. The result of the measurements is seen in Table 1.

Table 1.

*Uptake of  $^{42}\text{K}$  by the gastrocnemius of resting and swimming rats.*

Rat	Killed after	Per cent of the activity injected, present in		Ratio of the $^{42}\text{K}$ content of 1 gm. muscle and 1 gm. plasma	Percentage cellular potassium exchange
		1 gm. plasma	1 gm. muscle		
Resting (I) . .	48 min.	0.080	0.102	1.27	6.7
Resting (II) . .	49 min.	0.102	0.162	1.59	7.4
Resting (III) .	51 min.	0.072	0.122	1.69	7.9
Swimming (IV)	47 min.	0.060	0.409	6.82	27.1
Swimming (V) .	48½ min.	0.088	0.868	4.17	18.5
Swimming (VI)	51 min.	0.060	0.492	8.20	39.8

As seen from the figures of Table 1, during the same time 4 times as much  $^{42}\text{K}$  penetrates into the working muscles as into the resting ones and it is of interest to note that the entirely exhausted rat Nr. VI which had to be assisted in the last phase of swimming shows the highest exchange figure. In spite of the fact that the muscle loses some of its potassium content during work, a much larger percentage of the potassium atoms which at the start of the experiment were in the plasma (extracellular space) is found in the working muscle than in the resting one. This result clearly demonstrates that the permeability of the muscle cell wall to potassium ions strongly increases during strenuous muscular work. While in the course of 50 minutes about 0.2 mgm. plasma potassium penetrates into the cells of 1 gm. of the resting muscle and the same amounts move in the opposite direction, in the working muscle about  $4 \times 0.2$  mgm. moved from the plasma into the cells and  $4 \times 0.2$  plus 0.2 mgm. in the opposite direction. The figure 0.2 mgm. which corresponds to the loss of potassium by 1 gm. rat muscle under 50 minutes stimulation follows from the results of FENN and COBB (1936 and FENN 1937). From the individual potassium ions present in the cells of 1 gm. muscle under half an hour's muscular work, 1.0 mgm. will move into the plasma; from the resting muscle, only 0.2 mgm., thus about  $\frac{1}{5}$  of that found in the first mentioned case.

## Does all Muscular Potassium Ultimately Participate in the Potassium Exchange of the Working Muscle?

In the resting muscle, it was found (HEVESY and HAHN, 1941) that not all of the potassium present in the cells takes part in an exchange process. In order to investigate whether the same is the case in the working muscle we carried out experiments on rats which had exhausting work to perform repeatedly during the experiment. This exhaustion was obtained by letting rats swim 10—13 times, each time for 30 minutes. Between each swimming tour a rest of about  $1\frac{1}{2}$  hours was inserted so that the muscles were able to regain their original potassium content. As found by FENN and COBB, the change in the potassium content due to muscular work is largely reversible during 1—3 hours of recovery. As seen in the preceding section, about  $\frac{1}{4}$  of the muscle potassium exchanges in the swimming rat in the course of 50 min., while, as stated by FENN and COBB, about  $\frac{1}{14}$  of the muscle potassium is lost during the same time. During recovery, the amount lost will to a large extent be taken up again. If now, under the next swimming performance, the muscle comes again into action, one would expect another fraction of the muscle potassium to be mobilized, a fraction which had not participated in the potassium turnover during the first swimming tour. This was found, however, not to be the case. Even if the rats were forced to swim for 30 min. and to rest for some hours alternately as often as 13 times, we found the same percentage of the muscle potassium which had participated in an exchange process during the first swimming performance alone to take part in the further potassium exchange while the rest (about  $\frac{2}{3}$ ) of the muscle potassium remained unchanged.

While in experiments lasting only 50 min. the difference in the  $^{42}\text{K}$  content of the muscles between the resting and swimming rats was very large, no significant difference was found in experiments taking 24 hours. During that time, practically all exchangeable potassium exchanges in the resting muscle and, therefore, muscular exercise cannot result in an increase of the  $^{42}\text{K}$  content of the muscle as shown in Table 2.

The rats Nrs. X, XI and XII were kept swimming for 30 min., then they rested for  $1\frac{1}{2}$  hours and, thereupon, were forced to swim again for 30 min. This procedure was repeated 10—13 times. Both

the resting and the swimming rats were killed 24 hours after, the subcutaneous injection of  $^{42}\text{K}$ . The total time of swimming is stated in Table 2.

Table 2.

*Uptake of  $^{42}\text{K}$  by the gastrocnemius of resting and swimming rats.*

Rat	Per cent of the activity injected, present in		Ratio of the $^{42}\text{K}$ content of 1 gm. muscle and 1 gm. plasma	Percentage cellular potassium exchange
	1 gm. plasma	1 gm. muscle		
Resting (VII) . . .	0.054	0.54	10.0	36
Resting (VIII) . . .	0.068	0.68	10.0	37
Resting (IX) . . .	0.065	0.68	9.7	35
Swimming for 4.9 hours (X) . . . .	0.066	0.61	9.2	37
Swimming for 5.7 hours (XI) . . . .	0.055	0.55	10.0	41
Swimming for 6.6 hours (XII) . . .	0.054	0.50	9.3	44

Table 3.

*Potassium exchange in the cardiac muscle of the rabbit.*

Organ	Time	$^{42}\text{K}$ content per gm. tissue	Cellular $^{42}\text{K}$ content per gm. tissue	Potassium content in mgm. per cent	Percentage exchange of cellular potassium
Plasma . . . .	210 min.	100	—	14	—
Gastrocnemius .	210 min.	86	75	438	2.4
Cardiac muscle .	210 min.	346	315	360	12.4
Plasma . . . .	210 min.	100	—	18	—
Gastrocnemius .	210 min.	99	88	430	3.7
Cardiac muscle .	210 min.	281	250	360	12.5
Plasma . . . .	48 hours	100	—	15	—
Gastrocnemius .	48 hours	909	898	435	31
Cardiac muscle .	48 hours	641	610	360	26
Plasma . . . .	64 hours	100	—	20.7	—
Gastrocnemius .	64 hours	618	607	430	29
Cardiac muscle .	64 hours	486	455	360	26

### Cardiac Muscle.

The cardiac muscle is constantly working. As the stimulated gastrocnemius was found to take up more labelled potassium than the resting gastrocnemius one has to expect to find a faster potassium exchange in the heart muscle than in the resting voluntary muscle. In experiments taking a few hours only that was found to be the case (see Table 3). After the lapse of 210 minutes the potassium exchange was found to be about 4 times larger in the cardiac muscle of the resting rabbit than in the gastrocnemius. In experiments of long duration, however, no significant difference was found between the potassium exchange of the voluntary and the cardiac muscle. In experiments of long duration all ex-

Table 4.

*Potassium exchange in the cardiac muscle of the rat in the course of 24 hours.*

Organ	$^{42}\text{K}$ content per gm. tissue	Cellular $^{42}\text{K}$ content per gm. tissue <sup>1</sup>	Potassium content in mgm. p.c.	Percentage cellular potassium exchange
<i>Resting rat.</i>				
Plasma . . . . .	100	—	15.6	—
Gastrocnemius . . .	1,000	987	425	36
Cardiac muscle . . .	585	564	330	27
Plasma . . . . .	100	—	16.0	—
Gastrocnemius . . .	1,000	987	426	37
Cardiac muscle . . .	726	705	330	34
<i>Swimming rat.</i>				
Plasma . . . . .	100	—	16.6	—
Gastrocnemius . . .	1,000	987	400	41
Cardiac muscle . . .	706	685	330	35
Plasma . . . . .	100	—	19.2	—
Gastrocnemius . . .	930	917	400	44
Cardiac muscle . . .	615	594	330	35

<sup>1</sup> The extracellular volume of the gastrocnemius and of the cardiac muscle is assumed to make out 13 and 21 p.c., respectively, of the tissue weight.

changeable potassium exchanged in the voluntary muscle, and since the amount of exchangeable potassium is about the same in both muscle types no difference can be expected between the potassium exchange in the gastrocnemius and the heart muscle. The same result is brought out by the investigation of the potassium exchange in the resting and in the stimulated gastrocnemius. In experiments taking but 50 minutes a four times as large potassium exchange takes place in the case of the stimulated muscle. In experiments taking 24 hours no difference is found. From the lack of difference between the potassium exchange of the stimulated and of the resting muscle in experiments of long duration it follows that in both processes the same fraction of the total cellular potassium participates. Muscular exercise accelerates the exchange besides leading to a temporary loss of a part of the cellular potassium but does not mobilize the greater, non-exchangeable fraction of the muscle potassium.

### Liver.

As percentage the potassium content of the liver<sup>1</sup> of the rat makes out  $\frac{4}{5}$  of the percentage potassium content of the gastrocnemius and as the  $^{42}\text{K}$  content of 1 gm. liver is found 24 hours after the start of the experiment to be  $\frac{4}{5}$  of that of 1 gm. gastrocnemius (see Table 5) we have to conclude that about the same percentage of the liver potassium is exchangeable as that of the muscle potassium.

Table 5.

*Potassium exchange in the liver of rats in the course of 24 hours.*

Rat	Per cent of $^{42}\text{K}$ administered found in		Ratio of the $^{42}\text{K}$ content of 1 gm. liver and 1 gm. gastrocnemius
	1 gm. liver	1 gm. gastrocnemius	
Control . . . . .	0.40	0.54	0.74
Control . . . . .	0.57	0.68	0.90
Swimming . . . . .	0.46	0.55	0.84
Swimming . . . . .	0.38	0.50	0.76

<sup>1</sup> We found the rats liver to contain in the average 330 mgm per cent potassium.

### Corpuscles.

Table 6 contains data on the exchangeability of the corpuscle potassium. The corpuscles of the rats investigated by us were found to have a similar potassium content as the gastrocnemius, 415 mgm. per cent, on the average. The corpuscle potassium exchange was found to be 90 per cent of that of the muscular potassium exchange in the control rats and 70 per cent in the swimming rats.

Table 6.

*Potassium exchange in the red corpuscles of rats in the course of 24 hours.*

Rat	Per cent of $^{42}\text{K}$ administered found in		Ratio of the $^{42}\text{K}$ content of 1 gm. corpuscles and 1 gm. gastrocnemius	Percentage corpuscular potassium exchange
	1 gm. corpuscles	1 gm. gastrocnemius		
Control . . . . .	0.58	0.63	0.92	34
Control . . . . .	0.56	0.63	0.89	31
Swimming . . . . .	0.50	0.61	0.82	28
Swimming . . . . .	0.40	0.55	0.73	28

### Loss of Muscle Potassium by Animals kept on a Diet Deficient in Potassium.

As mentioned above, under muscular work a loss of muscle potassium occurs which is fully or to a large extent compensated by an uptake of sodium. The loss of potassium observed under prolonged stimulation is about 15 per cent of all the potassium present in the muscle. The potassium content of the muscle can also be diminished by keeping the animal on a diet deficient in potassium, as reported by different experimenters. Experiments of very long duration were carried out recently by HEPPEL (1939) who kept rats on a diet deficient in potassium for 86 days. A very appreciable decrease in the muscle potassium of these rats was found, the potassium content decreasing from 430 to 250 mgm. per cent. No further reduction could, however, be achieved by continuing the experiments until the rats became moribund. A partial replacement of potassium by sodium was found to appear. In the above investigation and likewise in our exchange experi-

ments an appreciable part of the muscle potassium was, thus, found to be prevented from leaving the cells.

### Experiments in Vitro.

The results of experiments in vitro must be interpreted very cautiously, since the penetration or the lack of penetration of substances into the cells and vice versa is often not a simple diffusion process but is intimately connected with metabolic processes. Sodium, for example, does not penetrate to a significant extent into the cells of the resting muscle in vivo; in vitro, however, the uptake of a large amount of sodium by the sartorius of the rat is reported (BURR-STEINBACH, 1940) and a similar observation was made in this laboratory by O. H. REBBE. The last mentioned experimenter found in experiments in vivo that the radio-sodium content of 1 gm. gastrocnemius or sartorius of the frog makes out 15 p.c. or less of the radio-sodium content of 1 gm. plasma. In experiments in vitro, in which the muscle was placed for 2 hours in a Ringer solution, the corresponding figure was found to be 25.

It is of interest, further, to recall some experiments carried out by ERNST and FRICKER (1934) on minced frog muscle suspended in water. They found that no more than  $\frac{1}{5}$  to  $\frac{1}{3}$  of the potassium content of the frog muscle goes into solution and they concluded from this fact that the major part of the muscle potassium of the frog is present in an "indiffusible" state. They found, finally, that stimulation or tetanus increases the "diffusible" fraction to  $1\frac{1}{2}$ —3 times the figures mentioned above.

The sartorius of a frog immersed in a Ringer solution free from potassium was found by BURR-STEINBACH (1940) to give off potassium and to take up sodium. The process was found to be reversible only as long as no more than half of the muscle potassium was lost.

### Maintenance of the Difference in the Potassium Concentration of Cell Water and Extracellular Water.

The potassium concentration of muscle cell water is about 30 times as large as the potassium concentration of the extracellular water (plasma). It is a puzzling problem of cell physiology how such a great concentration difference can be maintained all through life. Four explanations may be put forward to account for this difference. a) The potassium ions cannot penetrate through the

## INDEX AUCTORUM.

	Pag.
APÉRIA, A., A New Physical Stroke-Volume Formula . . . . .	64
ASTRUP, T., and S. DARLING, Preparation and Purification of Thrombin . . . . .	22
BERNHARD, C. G., and C. R. SKOGLUND, Selective Suppression with Ethylalcohol of Inhibition . . . . .	10
BERNHARD, C. G., U. S. v. EULER and C. R. SKOGLUND, Post-tetanic Action Potentials . . . . .	284
BROMAN, T., Farbindikatormethode und Bluthirnschranke . . . . .	83
BROMAN, T., and D. JACOBSON, Oxygen Consumption of Cat's Brain . . . . .	324
DARLING, S., and T. ASTRUP, Preparation and Purification of Thrombin . . . . .	22
EDMAN, P., und E. JORPES, Emulsin . . . . .	41
EMMELIN, N., Evipan and Parasympathetic Nervous System . . .	289
EMMELIN, N., G. KAHLSON and K. LINDSTRÖM, Liberation of Histamine from the Skin . . . . .	78
EMMELIN, N., G. KAHLSON, and F. WICKSELL, Blood Histamine in Reactive Hyperaemia . . . . .	110
EMMELIN, N., G. KAHLSON and F. WICKSELL, Histamine in Plasma	123
EULER, U. S., C. G. BERNHARD and C. R. SKOGLUND, Post-tetanic Action Potentials . . . . .	284
EULER, U. S., G. LILJESTRAND and Y. ZOTTERMAN, Baroceptive Impulses of Carotid Sinus . . . . .	1
EULER, U. S., and T. SJÖSTRAND, Renin Pressor Action . . . . .	264
EULER, U. S., und T. SJÖSTRAND, Vasokonstriktorische Wirkung von Nierenextrakten . . . . .	274
EULER, U. S., und H. WAHLUND, Zentrale Kurarewirkungen . . .	327
FISCHER, A., Aminosäuren und Gewebszüchtung . . . . .	143
GRANIT, R., Isolation of Colour-sensitive Elements . . . . .	93
GRANIT, R., Relation between Rod and Cone Substances . . . . .	334
HAHN, L., and G. HEVESY, Potassium Exchange in Muscle . . . . .	51
HEVESY, G., and N. NIELSEN, Potassium Exchange in Yeast Cells	347
HOLMBERG, G., Verteilung des Kupfers im Blut . . . . .	71
JACOBSON, D., and T. BROMAN, Oxygen Consumption of Cat's Brain . . . . .	324
JORPES, E., und P. EDMAN, Emulsin . . . . .	41
KAHLSON, G., N. EMMELIN and K. LINDSTRÖM, Liberation of Histamine from the Skin . . . . .	78



cell wall. b) They are prevented from leaking out of the cells by electric forces. c) They are bound inside the cells to such units which cannot penetrate through the cell wall. d) A constant loss of potassium from the cells takes place, but the loss is compensated by an equivalent secretion of potassium into the cells.

By the fact that the stimulated muscle loses a part of its potassium content it is shown that potassium ions can penetrate through the wall of the stimulated muscle. The experiments in which labelled potassium is used as an indicator lead to the result that the cell wall of the resting muscle is permeable to potassium as well. In fact, the cells of the resting muscle constantly lose potassium to the extracellular fluid, but the loss is compensated by an equal influx of other potassium ions previously located in the extracellular fluid. We have to assume that the amounts of sodium which are involved in a corresponding process are small only. In our experiments we found, furthermore, that in the same time unit a much larger amount of potassium passes the cell wall of the stimulated muscle than the resting muscle, not only in the direction from the cells into the plasma but also in the opposite direction.

We find that a large percentage of the potassium ions originally present in the plasma is located in the muscles after the lapse of an hour or two, and we would expect that, if the potassium content of the plasma is brought, for example, up to twice of its normal value, that a large part of this additional potassium would be located in the muscle cells too. No or a small accumulation of potassium only is, however, found to take place in the muscle cells after an increase in the potassium content of the plasma [see for example FENN (1939); MILLER and DARROW (1940)]. We can explain this discrepancy by assuming that a small part of the potassium of the muscle cells is present as free potassium ion, only. If, for example, only 1 per cent of the muscle potassium is present in free state in the muscle cells, an increase in the plasma potassium content of 100 per cent can only be expected to lead to a corresponding increase in the concentration of the *free* potassium content of the muscle cells, thus to an insignificant increase in the *total* potassium content of the cells.

We can just as little expect a substantial rise in the potassium content of the muscle cells as a result of a substantial increase in the potassium content of the plasma as we can expect a substantial rise in the phosphorus content of the muscle cells follow-

ing an increase in the phosphate concentration of the plasma. The free phosphate of the cells will correspondingly increase, but the free phosphate makes out but a small percentage of the total phosphorus. This lack of accumulation of phosphorus in the cells following an increase in the phosphate concentration of the plasma will not hinder an ultimate replacement of the whole cell P by labelled plasma P. Due to the enzymatic degradation and new formation of the organic P compounds incessantly going on in the cells, the labelled P will have opportunity to be incorporated into the molecules of the organic P compounds while a corresponding number of non-labelled P atoms will migrate in the plasma. The lack of accumulation of substantial amounts of potassium in the muscle cells will not hinder the incorporation of labelled potassium into the organic potassium complexes which will be presumably renewed by enzymatic processes as are the phosphorus compounds. The "non-exchangeable" potassium can be assumed to be incorporated in such molecules which are renewed at a slow rate, only. In view of the short life of radiopotassium, it is not possible to follow the potassium replacement for many days as is possible in case of phosphorus and where the rate of renewal of substances which are resynthesised at a very slow rate can still be determined.

The above considerations permit also to interpret the remarkable behaviour of the muscle recovering after stimulation as to its sodium content, as will be discussed in a paper to be published shortly.

### Summary.

The uptake of labelled potassium by the skeletal muscle of resting and of swimming rats was determined. The gastrocnemius of rats swimming for half an hour take up about four times as much  $^{42}\text{K}$  as the gastrocnemius of resting rats. Strenuous muscular exercise increases, thus, strongly the permeability of the cell wall to potassium.

In experiments taking 24 hours, in which some of the rats were made 10—13 times to swim, each time for about 30 min., while other rats were kept as controls, no significant difference was found between the  $^{42}\text{K}$  uptake by the resting and the working gastrocnemius. During this time, practically all exchangeable potassium was replaced by plasma (extracellular) potassium both in the resting and in the stimulated muscle. The amount of exchangeable potassium which was found to be about  $\frac{1}{3}$  of the

total potassium content of the gastrocnemius was thus not found to be increased by strenuous exercise.

The cardiac muscle being a constantly working muscle exchanges about 4 times as much potassium as does the resting gastrocnemius in experiments taking 3½ hours. In experiments taking 24—64 hours, during which time most of the exchangeable potassium is replaced in the cardiac and the resting voluntary muscle as well, no significant difference in the extent of potassium exchange of the gastrocnemius and the cardiac muscle is found.

The liver potassium is replaced by plasma potassium at a faster rate than the potassium of the gastrocnemius. The exchangeable part of the liver potassium is, however, about as large as that of the muscle potassium.

The results are interpreted by assuming that most of the potassium of the muscle cells is present in a bound, non-diffusible state. The potassium containing compounds are alternatively degraded and resynthesised and in the course of these processes labelled potassium gets incorporated in the compounds. The rate of renewal of one or more of the potassium containing compounds being slow the corresponding percentage of the cellular potassium is found to be non-exchangeable in the course of the experiment.

#### References.

- BAETJER, A. M., *Amer. J. Physiol.* 1935, *112*, 139.  
 BURR-STEINBACH, H., *J. biol. Chem.* 1940, *133*, 695.  
 CHRISTENSEN, H. N., and A. B. HASTINGS, *Ibidem* 1940, *136*, 387.  
 ERNST, E., and L. SCHEFFER, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1928, *220*, 655.  
 ERNST, E., and L. CSÜCS, *Ibidem* 1929, *223*, 663.  
 ERNST, E., and J. FRICKER, *Ibidem* 1934, *234*, 399, 360.  
 EWIG, W., and R. WIENER, *Z. ges. exp. Med.* 1928, *61*, 562.  
 FENN, W. O., *Amer. J. Physiol.* 1937, *120*, 678.  
 FENN, W. O., *Ibidem* 1939, *127*, 356.  
 FENN, W. O., and D. M. COBB, *J. gen. Physiol.* 1934, *17*, 629.  
 FENN, W. O., and D. M. COBB, *Amer. J. Physiol.* 1935, *112*, 41.  
 FENN, W. O., and D. M. COBB, *Ibidem* 1936, *115*, 345, 347.  
 FENN, W. O., D. M. COBB, J. F. MANERY and W. R. BLOOR, *Ibidem* 1938, *121*, 595.  
 HEPPEL, L. O., *Amer. J. Physiol.* 1939, *127*, 385.  
 HEVESY, G., and L. HAHN, *Det Kongel. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd.* 1941.  
 KEHAR, N. D., and D. R. HOOKER, *Amer. J. Physiol.* 1935, *112*, 301.  
 MALORNY, G., and H. NETTER, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1937, *238*, 153.  
 MILLER, H. C., and H. C. DARROW, *Amer. J. Physiol.* 1940, *130*, 750.  
 MITCHELL, P. H., and J. W. WILSON, *J. gen. Physiol.* 1927, *4*, 45.  
 THALER, J. I., *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, 1936, *33*, 368

From the Pharmacological Department of the Caroline Institute,  
Stockholm.

## A New Physical Stroke-Volume Formula and Its Applications.<sup>1</sup>

By

A. APÉRIA.

---

### I.

What might be called the chief problem of hemodynamics, i. e. the physical determination of the stroke-volume, cannot as yet be considered theoretically solved (APÉRIA, 1940). It was shown that the existing stroke-volume formulae were sometimes over 300 % out and were in consequence often practically useless. A recent paper by WETTERER (1940) has scarcely changed this situation.

A statement will now be made of a partially empirically found physical stroke-volume formula for basal conditions, which has shown good agreement with the values, obtained by means of GROLLMAN'S acetylene method. The formula is based on FRANK'S airchamber theory and the homogeneous undulatory theory. Beyond these a factor  $k$  is used, which unites the two theories.  $k$  is the ratio between the mean velocity  $\bar{u}$  and the axial velocity  $u$  in a cross-section. MOENS, for the rest, found 1878 by means of experiment an analogous correcting factor, though of no influence upon the later literature.

The following expression for the stroke-volume  $V_{s,\gamma}$  is derived from the air-chamber theory for stationary conditions:

$$(1) \quad V_{s,\gamma} = \frac{1}{w} \int_0^T P dt,$$

where  $w$  indicates the peripheral resistance,  $P$  the pressure,  $t$  the time and the integral expression the pressure surface  $F$  for the pulse period  $T$ . The pressure for the purpose in question is measured at the femoral artery.

<sup>1</sup> Received 20 January, 1940.

An expression derived straight from a pressure-curve is the diastolic relative pressure-fall intensity  $\gamma$ , which is the ratio between the elasticity modulus  $E$  for the volume unity and  $w$ .  $\gamma$  is here obtained from the femoralis curve. In the previous one-curve analysis of the author the peripheral diastole has been therewith used. For our new purpose two curves are needed, and the correct central diastole is to be taken (a remark for which the author is obliged to Prof. MÜNTZ) and  $\gamma$  may now be calculated with the central diastolic time. From that will be obtained:

$$(2) \quad V_{s, \gamma} = \frac{\gamma F}{E}$$

$E$  indicates the relation between the relative elasticity modulus  $\varkappa$  and the air-chamber volume  $V$ . According to the homogeneous undulatory theory, and with regard to the factor  $k$ ,  $\varkappa$  is obtained as  $\frac{\rho c^2}{k}$ .  $\rho$  represents the density of the blood,  $c$  the wave velocity of the pulse between the aorta or the subclavia and the femoralis respectively.  $V$  is equal to the cross-section  $Q$  of the aorta ascendens which is obtained statistically (SUTER, 1897) or according to BAZETT u. o. (1935) or roentgenologically, multiplied by the length  $L$  of the air-chamber.  $L$  is under basal conditions to be indicated as  $1\frac{1}{3}$  the projected length of the vessel between the root of the aorta and the femoralis at the crease of the groin. If the magnitudes mentioned are set in, the following formula is obtained:

$$(3) \quad V_{s, \gamma} = \frac{k \gamma Q L F}{\rho c^2}$$

Applying this formula practically we verify soon that a further correction is necessary. It then seems plausible to relate this correction to the length of the air-chamber. It has now been empirically proved that the above stated length of the artery system, which on the average serves mainly as an air-chamber, is best corrected with the diastolic time  $D$  related to a normal diastolic time  $D_n$  of 0.6 sec. This signifies only, that a longer air-chamber needs a correspondingly longer time for emptying: a result, plausible perhaps also theoretically. The final formula will then be:

$$(4) \quad V_{s, \gamma} = \frac{k \gamma Q L F}{\rho c^2} \times \frac{D}{D_n}$$

$k$  is taken for the central vessels as  $= 0.6$ ,  $\rho = 1.06 \text{ gr cm}^{-3}$ . Comparative stroke-volume investigations with GROLLMAN'S acetylene method have been carried out under basal conditions in a number of cases by means of this formula. The results are given below in tabular form.  $V_S$  means the stroke-volume found by gas analysis. The average absolute deviation as compared with the acetylene method is about 11.3 %. The deviation, moreover, proves more satisfactory with  $D = 0.62 \text{ sec.}$ , as it thus amounts to 9.9 %.

Table I.

Comparison between the cardiac output  $V_S$  found by gas analysis and the calculated  $V_{S,\gamma}$  according to the formula (4).

Sign.	Age	Blood pressure in mm Hg		Mean pr. art.fem	c in cm sec-1	T in $\sigma$	D in $\sigma$	$V_S$ in cm <sup>3</sup>	$V_{S,\gamma}$ in cm <sup>3</sup>
		art.brach.	art.fem.						
St-n	20	119/78	193/136	160	505	910	610	66	67
P-n	20	122/85	185/125	146	600	790	530	46	42
J-n	21	115/70	165/100	129	500	1,000	700	58	73
W-g	24	138/68	175/90	120	600	720	480	54	55
S-n	28	110/75	160/122	141	700	850	560	28	25
H-g	29	120/75	190/120	148	580	1,020	720	68	74
H-m	29	109/64	157/106	122	520	900	590	57	64
S-w	30	112/82	168/116	137	550	1,000	690	66	71
S-e	30	115/70	160/100	117	600	1,390	1,000	74	83
N-n	31	125/80	160/95	122	680	580	310	36	27
J-m	32	120/75	160/100	128	610	1,130	840	68	75
P-e	32	115/72	175/110	135	600	800	530	58	59
E-m	40	138/86	195/120	153	710	940	640	55	64
R-n	41	125/85	195/150	168	625	740	470	42	36
F-d	42	155/93	225/128	168	745	900	610	64	74
L-n	45	120/70	210/118	155	750	770	500	56	52
G-n	45	245/145	310/180	232	900	850	550	59	74
K-n	49	145/85	260/180	209	700	1,000	650	80	77
N-n	52	147/87	225/130	170	850	920	600	49	60
W-n	53	230/100	320/130	210	1,300	800	510	43	44
R-m	66	155/88	273/158	207	950	940	640	55	62
N-m	67	200/115	303/158	222	1,200	860	560	52	54
H-m	69	180/85	280/160	208	1,050	980	640	53	57
E-1	70	160/90	225/135	170	1,000	860	570	49	41

## II.

Further simplifications are desirable from a practical point of view. A simplification of this kind is indeed possible with reference to the calculation of  $\gamma$ . The expression for  $\gamma$  is:

$$\gamma = \frac{\log P_s^* - \log P_0^*}{D}; \log = \log \text{ nat.}$$

$P_s^*$  and  $P_0^*$  signify the end-systolic and the end-diastolic pressure respectively determined with the central diastolic time.  $D$  is the duration of the diastole.

According to the rules for development of logarithms in series we have:

$$\log \frac{1+z}{1-z} = 2 \left( \frac{z}{1} + \frac{z^3}{3} + \dots \right),$$

where  $z$  indicates an arbitrary value absolute  $\leq 1$ . According to this the following is obtained:

$$(5) \quad \gamma D = \log \frac{P_s^*}{P_0^*} = \log \frac{1 + \frac{P_s^* - P_0^*}{P_s^* + P_0^*}}{1 - \frac{P_s^* - P_0^*}{P_s^* + P_0^*}} \approx 2 \frac{P_s^* - P_0^*}{P_s^* + P_0^*} = \frac{P_s^* - P_0^*}{\frac{P_s^* + P_0^*}{2}}$$

The error is of the third order and amounts practically to less than 3 %. The expression obtained is analogous to LILJESTRAND'S and ZANDER'S reduced pulse-amplitude (1928) and may be considered in connection with that amplitude.

a) If the above expression is set in formula (4) and if  $\frac{k}{D_n}$  is substituted by  $\frac{1}{T_n}$ , where  $T_n$  can be regarded as the normal pulse-period, the following stroke-volume is obtained:

$$(6) \quad V_{s, \Delta_{r,f}^*} = \frac{\Delta_{r,f}^* P_m Q L}{\rho c^2} \times \frac{T}{T_n}$$

$\Delta_{r,f}^*$  indicates therewith the reduced pressure-difference at the femoralis stated with the central diastolic time as in (5). The pressure surface  $F$  is substituted by the mean pressure  $P_m$  multiplied by the pulse-period  $T$ . If the stroke-volume is calculated according to that formula an average absolute deviation of 10.8 % is obtained compared with the acetylene method.

b) The relation between the reduced amplitude  $\Delta_{r,f}^*$  indicated

above and the ordinary reduced one at femoralis  $\Delta_{r,f}$  is 0.8 with an average absolute deviation of 7 %. If that amplitude with a correction-factor of 0.8 is set in the formula (6) an average absolute deviation even of only 9.4 % is obtained.

c) The reduced amplitude at femoralis  $\Delta_{r,f}$  stands normally in a comparatively constant relation to that at brachialis  $\Delta_{r,br}$ . The average difference is about 5 %. If that amplitude with a factor of 0.72 is set in the formula (6) an increased deviation amounting to 14.4 % is obtained.

d) The mean pressure at femoralis  $P_m$  stated in the formula (6) stands in a rather constant relation, somewhere about 1, to the arithmetical mean-pressure  $\frac{P_s^* + P_0^*}{2}$ . If the two expressions are shortened with recompensation by a correction-factor 0.95 the absolute deviation amounts now to 9.2 %.

e) The relation between  $P_m$  and the ordinary arithmetical mean pressure at femoralis is on the average 0.95 with an average absolute deviation of 1.5 %. If therefore the two expressions are shortened and if the factor 0.95 is used multiplied by the above-mentioned factor 0.8, consequently 0.76, an average absolute deviation of 9.6 % is obtained. The formula is as follows:

$$(7) \quad V_{s, \Delta_f} = \frac{0.76 \Delta_f Q L}{\rho c^2} \times \frac{T}{T_n}$$

$T_n = 1$  sec.  $\Delta_f$  thus signifies the pulse-amplitude at femoralis.

f) From the point of view of practical simplifications the mean pressure at femoralis may be finally substituted by the arithmetical mean pressure at brachialis multiplied by an appropriate average correction-factor, in this case 1.43. These amplitudes stand indeed also in a relatively constant relation to another, the absolute deviation however being here 9 %. Together with the brachialis-factor 0.72 used above these two expressions may be replaced by the factor 0.97 at  $T_n$ . As before, with brachialis too, the deviation will now be greater than at femoralis and will amount to 13.3 %. This may perhaps be compensated by certain advantages, such as measuring the blood pressure on the arm instead of on the thigh during exercise. The formula will here be:

$$(8) \quad V_{s, \Delta_{br}} = \frac{\Delta_{br} L Q}{\rho c^2} \times \frac{T}{T_n}$$

where  $T_n$  is 0.97 sec.  $\Delta_{br}$  is the pulse-amplitude at brachialis.



The calculation becomes simplest with using c. g. s. units. We obtain then the cardiac output directly in cm<sup>3</sup>. The sign. K—n below may be taken as example. The blood pressure at brachialis is 145/85 mm Hg, the pulse amplitude  $\Delta_{br}$  thus 60 mm Hg = 6 cm Hg =  $6 \times 13.6 \times 981$  dyn cm<sup>-2</sup>.  $Q$  is statistically for 49 years to be taken = 4.8 cm<sup>3</sup>. The projected arterial length above is 66 cm, therefore  $L = 3/2 \times 66$  cm = 99 cm.  $T = 1$  sec,  $T'_u = 0.97$  sec.  $\rho = 1.06$  gm cm<sup>-3</sup>.  $c = 700$  cm sec<sup>-1</sup>. The formula above gives now:

$$\frac{6 \times 13.6 \times 981 \times 99 \times 4.8 \times 1.0}{1.06 \times 700 \times 700 \times 0.97} \text{ cm}^3 = 75 \text{ cm}^3.$$

Table II.

Comparison between the different determinations of the cardiac output.

Sign.	Bl. pr. P <sub>s</sub> * P <sub>o</sub> *	V <sub>S</sub> in cm <sup>3</sup>	V <sub>S, Δ<sub>r,f</sub>*</sub> a	V <sub>S, Δ<sub>r,f</sub></sub> b	V <sub>S, Δ<sub>r,br</sub></sub> c	V <sub>S, Δ<sub>f</sub>*</sub> d	V <sub>S, Δ<sub>f</sub></sub> e	V <sub>S, Δ<sub>br</sub></sub> f
St-n	188/141	66	67	66	70	66	64	62
P-n	182/131	46	41	39	33	42	39	33
J-n	142/100	58	71	79	72	63	78	74
W-g	172/99	54	55	52	48	59	55	61
S-n	158/127	28	25	25	32	24	24	28
H-g	175/122	68	74	75	70	71	75	64
H-m	150/108	57	64	60	72	63	61	72
S-w	164/118	66	70	62	65	62	62	66
S-e	149/100	74	81	76	72	81	80	81
N-n	148/105	36	27	32	25	27	32	30
J-m	151/114	68	72	60	54	68	68	60
P-e	170/112	58	59	52	47	59	52	47
E-m	177/120	55	62	60	54	56	60	56
R-n	189/154	42	35	36	47	31	35	42
F-d	215/130	64	72	64	55	70	66	57
L-n	196/126	56	52	54	45	51	53	40
G-n	303/184	57	72	63	55	72	60	66
K-n	226/180	80	77	74	95	71	74	75
N-n	216/135	49	59	55	49	57	54	48
W-n	261/136	43	44	46	47	39	47	53
R-m	236/162	55	61	70	64	55	69	54
N-m	279/163	52	54	52	40	51	51	39
H-m	244/162	53	56	61	74	53	61	67
E-l	204/145	49	40	48	48	39	48	51
Average absolute deviation			10.8 %	9.4 %	14.4 %	9.2 %	9.6 %	13.3 %

Above there is given a table of stroke-volumes calculated with the different modifications of the given formula (6).  $V_s$  means again the stroke-volume found by gas analysis.

The exact degree of accuracy for the mentioned formulae can be proved only by further investigations.

### Summary.

The existing formulae for the calculation of the stroke-volume with the aid of a single air-chamber lead often to unacceptable contradictions with experience. A new formula is deduced for basal conditions. Comparative stroke-volume investigations with GROLLMAN'S acetylene method have been carried out in a number of cases. The average absolute deviation of the theoretical results from the gas analytical data is about 10 %.

### References.

- APÉRIA, A., *Skand. Arch. Physiol.* 1940, 83, Suppl. 16.  
BAZETT, H. C., F. S. COTTON, L. B. LAPLACE and J. C. SCOTT, *Amer. J. Physiol.* 1935, 113, 312.  
LILJESTRAND, G., and E. ZANDER, *Z. exp. Med.* 1928, 59, 105.  
MOENS, A. J., *Die Pulscurve*, Leiden 1878.  
SUTER, F., *Virchows Arch.* 1897, 39, 289.  
WETTERER, E., *Z. Biol.* 1940, 100, 260.
-

	Pag.
KAHLSON, G., N. EMMELIN and F. WICKSELL, Blood Histamine in reactive Hyperaemia . . . . .	110
KAHLSON, G., N. EMMELIN and F. WICKSELL, Histamine in Plasma	123
LEVI, H., A Geiger Counter Arrangement . . . . .	311
LILJESTRAND, G., U. S. v. EULER and Y. ZOTTERMAN, Baroceptive Impulses of Carotid Sinus . . . . .	1
LINDSTRÖM, K., N. EMMELIN and G. KAHLSON, Liberation of Histamine from the Skin . . . . .	78
NIELSEN, N., and G. HEVESY, Potassium Exchange in Yeast Cells	347
SJÖGREN, G., and C. G. SUNDBERG, Activity and Structure of Vitamin K . . . . .	227
SJÖSTRAND, T., Lungen als Blutdepot beim Menschen . . . . .	231
SJÖSTRAND, T., and U. S. v. EULER, Renin Pressor Action . . . . .	264
SJÖSTRAND, T., und U. S. v. EULER, Vasokonstriktorische Wirkung von Nierenextrakten . . . . .	274
SKOGLUND, C. R., and C. G. BERNHARD, Selective Suppression with Ethylalcohol of Inhibition . . . . .	10
SKOGLUND, C. R., C. G. BERNHARD and U. S. v. EULER, Post-tetanic Action Potentials . . . . .	284
SUNDBERG, C. G., and B. SJÖGREN, Activity and Structure of Vitamin K . . . . .	227
TVEDE-JACOBSEN, I. K., Blood-Flowmeter . . . . .	249
USSING, H. H., Protein Renewal in Mice and Rats . . . . .	209
USSING, H. H., Fate in Metabolism of Deuterium in Amino Acids	222
WAHLUND, H., und U. S. v. EULER, Zentrale Kurarewirkungen .	327
WASSMANN, K., Vitamin B <sub>1</sub> Determination in Urine . . . . .	355
WENNESLAND, R., Determination of Carbon Dioxide in Biological Fluids . . . . .	189
WENNESLAND, R., Determination of Carbon Monoxide Capacity of Blood . . . . .	198
WICKSELL, F., N. EMMELIN and G. KAHLSON, Blood Histamine in Reactive Hyperaemia . . . . .	110
WICKSELL, F., N. EMMELIN and G. KAHLSON, Histamine in Plasma	123
ZOTTERMAN, Y., U. S. v. EULER and G. LILJESTRAND, Baroceptive Impulses of Carotid Sinus . . . . .	1
ÅKERBLOM, E., Histaminbestimmung in Gewebsextrakten . . . . .	378
ØRSKOV, S., Permeabilität der roten Blutkörperchen . . . . .	366

## Über die Verteilung des Kupfers zwischen Plasma und roten Blutkörperchen bei extremen physiologischen Verschiebungen im Cu-Gehalt des Blutes.<sup>1</sup>

Von

CARL G. HOLMBERG.

---

Seitdem CALLAN und HENDERSON (1929) im Natriumdiäthyl-dithiocarbamat ein Kupferreagens von genügender Empfindlichkeit, eine quantitative Kupferbestimmung in verhältnismässig kleinen Mengen Blut zu erlauben, entdeckt haben, ist ein ziemlich umfassendes Schrifttum über das Blutkupfer erschienen. Eine grundlegende Frage, nämlich die Verteilung des Kupfers auf das Plasma und die roten Blutkörperchen ist indessen, soweit ich habe feststellen können, bisher nicht endgültig geklärt worden. So fanden z. B. SARATA und seine Mitarbeiter (1933) eine höhere Cu-Konzentration in den roten Blutkörperchen als im Plasma, während SCHULTZE, ELVEHEJM und HART (1936) den gegenteiligen Befund erhoben. TOMPSETT (1934) sowie BJERRUM und HENRIQUES (1935) schliesslich finden eine ziemlich gleichmässige Verteilung zwischen Plasma und Blutkörperchen, und zahlreiche neuere Untersuchungen scheinen von der Richtigkeit dieser Auffassung auszugehen.

Im folgenden soll gezeigt werden, dass, auch wenn die Verteilung des Cu auf das Plasma und die roten Blutkörperchen des Blutes gesunder Erwachsener ziemlich gleichmässig ist, dies doch bei den extremen Variationen des Blutkupfergehaltes, die unter gewissen physiologischen Bedingungen auftreten, nicht der Fall ist.

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 1. März 1941.

Tabelle I.

*Blut gesunder, nicht schwangerer Frauen.*

Nr.	Name	Cu im Plasma $\gamma$ pro 100 ml	Cu im Gesamtblut $\gamma$ pro 100 ml	Cu in den Blutkörperchen (berechneter Wert) $\gamma$ pro 100 ml.	Hämato- kritwert Vol%	
1.	F. F. . . . .	70	73	77	44	
2.	B. D. . . . .	122	80	22	41	
3.	R. H. . . . .	132	122	108	—	
4.	M. K. . . . .	83	83	83	—	
5.	E. D. . . . .	110	87	55	40	
6.	B. S. . . . .	125	104	75	41	
7.	B. N. . . . .	128	91	40	44	
8.	S. B. . . . .	95	85	71	—	
9.	L. E. . . . .	86	106	134	43	
10.	S. E. . . . .	110	110	110	45	
11.	S. M. . . . .	75	66	54	41	
12.	S. M. . . . .	113	94	68	43	
13.	S. I. H. . . . .	136	106	65	42	
14.	S. M. . . . .	149	122	95	39	
15.	M. L. B. . . . .	109	94	73	40	
16.	S. I. . . . .	136	120	98	39	
17.	S. E. . . . .	94	88	80	43	
18.	U. S. . . . .	80	86	94	42	
19.	S. E. . . . .	101	92	80	44	
20.	K. A. . . . .	113	114	115	40	
21.	S. R. H. . . . .	125	118	108	45	
22.	K. A. . . . .	137	84	11	41	
Mittelwert:		110	Mittelwert:	78	Mittelwert:	42
Streuung:		24	Streuung:	28		
Mittl. Fehler des Mediums:		5.1	Mittl. Fehler des Mediums:	5.9		

Da die Hämatokritwerte nicht für sämtliche Blutproben erhalten werden konnten, bedienen wir uns bei der Berechnung des Cu-Gehaltes der roten Blutkörperchen aus den beobachteten Werten im Plasma und Gesamtblut (Tabelle I—III) des mittleren Volumens der Blutkörperchen in der betreffenden Gruppe, was satthaft sein dürfte, da keine Korrelation zwischen den Hämatokritwerten und den Kupferwerten vorzuliegen scheint.

Durch Beobachtungen, die auf Untersuchungen von KREBS (1928) zurückgehen, wissen wir, dass das Blut von Schwangeren einen Kupfergehalt hat, der um 100 % oder mehr über dem gesunder, nicht schwangerer Frauen liegt; ferner wissen wir durch Untersuchungen von LOCKE, MAIN und ROSBACH (1932) u. a., dass das Nabelblut einen relativ niedrigen Kupfergehalt hat.

Tabelle II.

*Blut schwangerer Frauen bei der Geburt.*

Nr.	Name	Cu im Plasma γ pro 100 ml	Cu im Gesamtblut γ pro 100 ml	Cu in den Blutkörperchen (berechneter Wert) γ pro 100 ml	Hämatokritwert Vol%
1.	H. A. . . . .	258	200	113	34
2.	M. S. . . . .	317	240	124	—
3.	AG. N. . . . .	352	270	147	47
4.	N. G. . . . .	242	166	52	44
5.	C. S. . . . .	197	140	54	40
6.	E. A. . . . .	253	170	45	37
7.	M. M. . . . .	270	208	115	38
8.	G. M. . . . .	242	194	122	—
9.	S. C. . . . .	200	176	140	38
10.	S. B. . . . .	203	186	160	—
11.	G. J. . . . .	220	160	70	—
12.	A. E. . . . .	205	140	42	—
13.	E. S. . . . .	242	158	32	—
14.	R. N. . . . .	240	210	165	37
15.	ML. B. . . . .	237	180	95	31
16.	O. E. . . . .	172	125	55	40
17.	A. O. . . . .	262	192	87	—
18.	H. J. . . . .	273	187	58	44
19.	K. H. . . . .	263	194	91	43
20.	A. J. . . . .	249	234	212	42
21.	S. P. . . . .	251	188	94	40
22.	A. L. . . . .	285	246	188	37
	Mittelwert:	247	Mittelwert:	103	Mittelwert: 40
	Streuung:	39	Streuung:	49	
	Mittl. Fehler des Mediums:	8	Mittl. Fehler des Mediums:	10	

Mit einer Methode, deren Einzelheiten nachstehend beschrieben werden, haben wir eine Reihe von vergleichenden Analysen am Plasma und Gesamtblut gesunder Frauen, gesunder Schwangerer bei der Geburt und am Nabelblut ausgeführt (Tab. I—III). Aus den Analysenergebnissen ist der mittlere Cu-Gehalt des Plasmas und der roten Blutkörperchen innerhalb dieser drei Gruppen berechnet worden. Dabei zeigt es sich, dass der Cu-Gehalt des Plasmas der drei Gruppen etwa im Verhältnis 1 : 2.5 : 0.5 wechselt, während der mittlere Cu-Gehalt der roten Blutkörperchen im Vergleich hierzu ganz geringfügig schwankt. Es ist nicht einmal ausgeschlossen, dass die letzteren Variationen zufälliger

Tabelle III.

## Nabelschnurblut.

Nr.	Name	Cu im Plasma $\gamma$ pro 100 ml	Cu im Gesamtblut $\gamma$ pro 100 ml	Cu in den Blutkörperchen (berechneter Wert) $\gamma$ pro 100 ml	Hämatokritwert Vol%
1.	R. C. . . . .	82	84	86	59
2.	M. S. . . . .	55	104	146	—
3.	AG. N. . . . .	72	100	124	52
4.	N. G. . . . .	67	74	81	51
5.	S. E. . . . .	25	57	84	—
6.	C. S. . . . .	18	44	66	45
7.	E. A. . . . .	50	100	142	58
8.	I. N. . . . .	30	70	104	58
9.	M. M. . . . .	50	94	131	54
10.	R. N. . . . .	68	125	174	—
11.	A. P. . . . .	67	82	95	—
12.	H. J. . . . .	20	35	48	—
13.	I. Å. . . . .	55	80	101	—
14.	S. N. . . . .	58	65	71	—
15.	M. E. . . . .	55	89	118	—
16.	H. N. . . . .	27	97	156	54
17.	G. J. . . . .	50	54	57	—
18.	O. J. . . . .	42	74	94	66
19.	A. J. . . . .	61	70	78	—
20.	A. L. . . . .	33	66	94	49
21.	M. P. . . . .	44	78	107	49
22.	M. I. . . . .	52	67	80	51
	Mittelwert:	49	Mittelwert:	102	Mittelwert: 54
	Streuung:	25	Streuung:	31	
	Mittl. Fehler des Mediums:	5.3	Mittl. Fehler des Mediums:	6.6	

Art sein können. Es ist also der Schluss berechtigt, dass der Cu-Gehalt der roten Blutkörperchen eine recht konstante Grösse ist, der Cu-Gehalt des Plasmas dagegen starken physiologischen Schwankungen unterliegt. Es lässt sich keine Korrelation zwischen dem Cu-Gehalt des Plasmas und dem der roten Blutkörperchen feststellen.

### Experimentelles.

#### 1. Blutentnahme.

Das Blut wird durch Venenpunktion mit glatten, innen polierten Nadeln aus rostfreiem Stahl direkt in Zentrifugenröhrchen

genommen. Die Röhren sind mit 7—8 mg. Heparin präpariert. Wir haben uns überzeugt, dass die Nadeln keine messbaren Mengen Cu abgehen und dass das benutzte Heparin als von diesem Metall frei gelten kann.

## 2. Extraktion des Kupfers aus dem Plasma bzw. Gesamtblut.

6 ml Plasma oder Gesamtblut werden in einem kleinen Kolben mit 3 ml 6 n-Salzsäure versetzt; nach 10 Minuten werden 6 ml 20 % glasdestillierte Trichloressigsäure beigegeben, nach weiteren 10 Minuten Filtration durch Cu-freies Filter.

## 3. Analyse.

7.5 ml des Filtrats werden mit 1 ml 4 % Natriumpyrophosphat-lösung und einem Tropfen in Alkohol gelöstem 1 % p-Nitrophenol versetzt. Dann wird tropfenweise 15 % Ammoniak bis zum Farbumschlag zugesetzt und schliesslich tropfenweise  $n/2$  Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Farbe. Dann lässt man etwa 2 Minuten lang Sauerstoff hindurch strömen. Schliesslich werden 0.25 ml 0.1 % Natriumdiäthylthiocarbamatlösung zugesetzt, und die entstandene Farbe wird im Scheidetrichter mit 5 ml Amylalkohol geschüttelt. Die gelbe Farbe wird im Pulfrich Photometer kolorimetriert (Filter S 43, Schichtdicke 1 cm).  $k \cdot 890 = \gamma$  Cu in 100 ml Plasma oder Gesamtblut.

## 4. Leerversuch.

Bei jeder Analyse werden Leerversuche ohne Blut, doch mit sämtlichen Reagenzien, gemacht.

Sämtliche Reagenzien müssen von höchster analysenreiner Qualität sein. Alle benutzten Glaswaren werden mit analysenreiner Salzsäure und glasdestilliertem Wasser gespült.

Es hat sich als notwendig erwiesen, mit Salzsäurehydrolyse des Blutes zu arbeiten, da in Proben, die nur mit Trichloressigsäure hydrolysiert werden, manchmal eine störende Farbe mit starker Absorption im benutzten Spektralbereich auftritt.

## 5. Genauigkeit der Methode.

Sowohl an Serum als an Gesamtblut wurden eine Serie Doppelbestimmungen gemacht (Tab. IV und V). Es zeigt sich, dass der mittlere Fehler des Mittels aus zwei Plasmabestimmungen etwa 4,



Tabelle IV.

Tabelle V.

*Doppelbestimmungen.*

Plasma		Gesamtblut	
$\gamma$ Co	pro 100 ml	$\gamma$ Cu	pro 100 ml
212	218	104	122
110	113	44	46
78	78	74	74
77	75	248	238
113	113	184	182
43	45	76	80
291	306	66	68
51	53		
Mittl. Fehler des Mittels der Doppel- bestimmung: 4		Mittl. Fehler des Mittels der Doppel- bestimmung: 7	

Wiedergefundenes Kupfer nach Zusatz von 1.50  $\gamma$  zu 3 ml Plasma oder Gesamtblut.

Tabelle VI.

*Plasma.*

Gefundenes Cu in 3 ml Plasma	Gefundenes Cu in 3 ml Plasma nach Cu-Zusatz	Unterschied
0.42 $\gamma$	2.22 $\gamma$	1.80 $\gamma$
3.40 "	4.90 "	1.50 "
3.20 "	4.95 "	1.75 "
5.72 "	7.42 "	1.40 "
3.45 "	4.75 "	1.30 "
3.75 "	5.10 "	1.35 "
4.58 "	6.10 "	1.52 "

Wiedergefundenes Kupfer. Mittel: 1.52  $\pm$  0.07. Streuung: 0.16.

Tabelle VII.

*Gesamtblut.*

Gefundenes Cu in 3 ml Gesamtblut	Gefundenes Cu in 3 ml Gesamtblut nach Cu-Zusatz	Unterschied
1.00 $\gamma$	2.48 $\gamma$	1.48 $\gamma$
1.28 "	2.78 "	1.50 "
3.00 "	4.70 "	1.70 "
3.60 "	5.05 "	1.55 "
1.50 "	2.90 "	1.40 "
4.05 "	5.77 "	1.72 "
1.10 "	2.45 "	1.35 "
0.65 "	2.40 "	1.75 "
1.25 "	2.72 "	1.47 "
1.40 "	3.05 "	1.65 "

Wiedergefundenes Kupfer. Mittel: 1.55  $\pm$  0.007. Streuung: 0.20.

entsprechend bei Gesamtblut etwa 7  $\gamma$  Cu pro 100 ml Blut beträgt. Es sind auch Analysen in der Absicht ausgeführt worden, die Möglichkeit des Wiederfindens zugesetzten Kupfers sowohl im Plasma als im Gesamtblut festzustellen (Tab. VI und VII). Die Tabellen zeigen, dass die zugesetzte Kupfermenge in beiden Fällen ohne Verluste wiedergefunden wird. Schliesslich sei erwähnt, dass auch Versuche gemacht worden sind, um die Vollständigkeit der Extraktion zu kontrollieren, indem Parallelanalysen an veraschtem Material vorgenommen wurden. Dabei ergaben sich 5—10 % niedrigere Werte für letzteres Material, was natürlich den unvermeidlichen Verlusten durch Verflüchtigung zuzuschreiben ist.

### Zusammenfassung.

Der Kupfergehalt der roten Blutkörperchen des Menschen ist relativ konstant. Die physiologischen Schwankungen im Kupfergehalt des Blutes entfallen hauptsächlich auf die Variation des Serumkupfers.

Herr Professor WESTMAN hat mir freundlichst erlaubt Material für diese Untersuchung in der geburtshilflichen Abteilung des Krankenhauses zu sammeln. Hierfür spreche ich meinen Dank aus. Assistentärztze und Krankenschwestern in seiner Abteilung danke ich für Hilfe mit den Proben, Dr. Med. E. ESSEN-MÖLLER für statistische Ratschläge.

### Literaturverzeichnis.

- BJERRUM, J., und V. HENRIQUES, Skand. Arch. Physiol. 1935. 72. 271.  
 CALLAN, T., und J. A. RUSSELL HENDERSON, Analyst 1929. 54. 650.  
 KREBS, H. A., Klin. Wschr. 1928. 7. 584.  
 LOCKE, A., E. R. MAIN und D. O. ROSBACH, J. Klin. Invest. 1932.  
 SARATA, U., Jap. J. med. Sci. Biochem. 1933. 2. 261.  
 SCHULTZE, M. O., C. A. ELVEHEJM und E. B. HART, J. biol. Chem. 1936. 116. 93 und 107.  
 TOMPSETT, S. L., Biochem. J. 1934. 28. 1544.

# The Liberation of Histamine from the Skin during Anaphylactic Reaction in the Guinea Pig.<sup>1</sup>

By

NILS EMMELIN, G. S. KAHLSON and KARIN LINDSTRÖM.

---

Evidence is accumulating which tends to prove that histamine is liberated in anaphylactic reactions and that in guinea pigs and dogs histamine plays a part in producing the symptoms of shock. MANWARING, HOSEPIAN, O'NEILL and MOY (1925), DRAGSTEDT and GEBAUER-FUELNEGG (1932) demonstrated that a substance with physiological properties similar to histamine was liberated from the liver during anaphylactic shock in the dog. BARTOSCH, FELDBERG and NAGEL (1932, 1933), perfusing the isolated lung of an anaphylactic guinea pig with Tyrode's solution showed that when the sensitizing antigen is added to the inflowing solution a substance physiologically indistinguishable from histamine leaves the lungs.

In the present study the liberation of histamine from the skin during anaphylactic reaction will be demonstrated.

## Experimental.

Guinea pigs were sensitized to egg white or horse serum by injecting these proteins subcutaneously. Egg white was injected only once in a dose of 10 mg, horse serum on three subsequent days in doses of 0.25, 0.50 and 0.75 cc respectively. 2—3 weeks after the first injection paperthick plates of abdominal skin were excised and immediately tied over a glass tube (6 × 30 mm). The cut surface of the tissue was in contact with the Tyrode's

<sup>1</sup> Received 8 March 1941.

solution within the tube (0.5 cc). This method was originally used by ROSENTHAL and MINARD (1939) in experiments on histamine as the chemical mediator for cutaneous pain.

The diffusates were tested on an atropinized strip of guinea pig's small intestine, suspended in a 2 cc bath. Four skin plates were cut from each guinea pig, two of them serving as controls. The skin surface in contact with the Tyrode's solution was washed several times during 15 minutes. The diffusates contained only just detectable amounts of histamine. Antigen was then added to the Tyrode's solution in concentrations of 1:10<sup>5</sup> to 1:10<sup>6</sup> for horse serum and 1:10<sup>5</sup> to 1:10<sup>7</sup> for egg white. The solution containing the sensitizing protein was left in contact with the cut surface of the skin during 10—20 minutes. The diffusates were then tested on the gut without subjecting the solutions to any chemical treatment whatsoever. The results are given in table 1.

Table 1.

Nr	Time between first injection and adding of antigen. Days.	Concentration of antigen in the tube	Duration of action. Minutes	Liberated histamine in %	
				shock sample	control sample
1	20	horse serum 1:2·10 <sup>5</sup>	20	0.050	0.015
2	22	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.129	0.027
3	29	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.019	0.013
4	19	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.460	
		, , 1:2·10 <sup>5</sup>		0.220	0.000
		, , 1:10 <sup>5</sup>		0.000	
5	24	, , 1:10 <sup>5</sup>	10	0.060	0.013
6	31	, , 1:10 <sup>5</sup>	20	0.000	0.000
7	22	egg white 1:10 <sup>5</sup>	15	0.030	0.020
		, , 1:10 <sup>6</sup>		0.060	
8	18	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.020	0.000
9	18	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.025	
		, , 1:10 <sup>6</sup>		0.040	0.025
		, , 1:10 <sup>7</sup>		0.025	
10	38	, , 1:10 <sup>5</sup>	15	0.008	0.008
11	17	, , 1:10 <sup>5</sup>	20	0.080	0.015
		, , 1:10 <sup>6</sup>		0.085	

Fig. 1 illustrates the action of the diffusate on the atropinized guinea pig's intestine. The identity of the active agent with histamine is suggested by the following observations:

1. The histamine-like activity of the diffusate is not reduced by boiling during 30 minutes.

2. The histamine-like substance is destroyed on incubating 0.5 cc diffusate with 0.1 mg histaminase powder during 24 hours at 37° C and pH 7.0.

3. Thymoxyethyldiethylamine renders the guinea pig's gut insensitive to the active agent (Fig. 1). It is well established

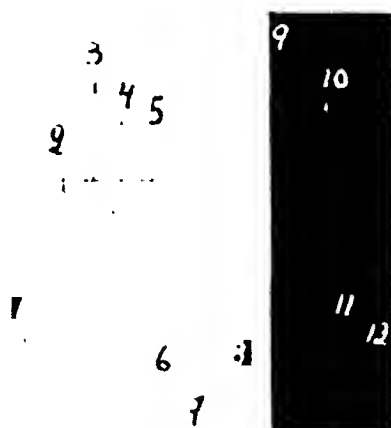


Fig. 1.

Pieces of guinea pig's small intestine suspended in 2 cc Tyrode's solution containing atropine sulphate  $1:2 \cdot 10^4$ .

- 1) 0.2 cc diffusate from control specimen.
- 2) 0.04  $\gamma$  histaminebase (Hi).
- 3) 0.2 cc diffusate after addition of antigen ("shock fluid").
- 4) 0.04  $\gamma$  Hi.
- 5) 0.15 cc "shock fluid".
- 6) 1  $\gamma$  thymoxyethyldiethylamin.
- 7) 0.2 cc "shock fluid".
- 8) 0.04  $\gamma$  Hi.
- 9) 0.2 cc "shock fluid" after 10 minutes' washing with Tyrode.
- 10) 0.04  $\gamma$  Hi.
- 11) 0.4 cc diffusate from control.
- 12) 0.005  $\gamma$  Hi.

that this phenol ether specifically abolishes the effects of histamine on smooth muscle (BOVET and STAUB 1937, STAUB 1939, ROSENTHAL and MINARD 1939).

Antigen, acting on skin plates from nonsensitized guinea pigs, did not promote the liberation of histamine into the diffusion fluid. Proofs of the anaphylactic state of the animals from which skin plates were excised were secured by adding the antigen to isolated strips of small intestine from the sensitized animals; the gut contracted in the typical manner described by SCHULTZ (1910) and DALE (1913).



Such skin plates from the abdominal region as used in these experiments yielded approximately 0.3—0.4  $\gamma$  histaminebase per gram of tissue weight when determined by CODE's modification (1937) of the BARSORUM-GADDUM method. The weight of the individual skin plates was 0.15—0.25 gram. It will be seen from table 1 that during 10—20 minutes of anaphylactic reaction most of the histamine normally contained in the skin is liberated into the surrounding fluid. It is further to be noted that the libera-

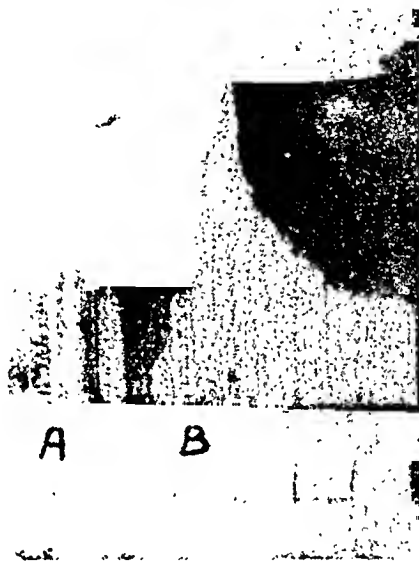


Fig. 2.

Registration of bronchiolar tone in guinea pig (urethane narcosis). Histamine injected intravenously, at A 0.2  $\gamma$ , at B 5  $\gamma$ . Time in minutes.

tion of histamine is not promoted if antigen is added at a period when the sensitized state is over (nrs. 6 and 10).

Using the method of KONZETT and RÖSSLER (1940) we find that in most guinea pigs, sensitized or nonsensitized, a very strong bronchoconstriction is caused by intravenous injection of 5—10  $\gamma$  histaminebase; a just demonstrable bronchoconstriction is obtained already after 0.1—0.2  $\gamma$  (fig. 2).

### Comment.

The liberation of histamine from the guinea pig's skin during anaphylactic reaction progresses very quickly. This fact may account for the rapid onset of anaphylactic shock symptoms in

the guinea pig. The total amount of histamine liberated from the skin during anaphylactic shock would cause a severe bronchoconstriction if injected into a guinea pig.

#### References.

- BOVET, D. and A. M. STAUB, C. R. Soc. Biol., Paris 1937, *124*, 547; 1937, *125*, 818.  
CODE, C. F., J. Physiol. 1937, *89*, 257.  
DALE, H. H., J. Pharmacol. 1913, *4*, 167.  
DRAGSTEDT, C. A. and E. GEBAUER-FUELNEGG, Amer. J. Physiol. 1932, *102*, 512, 520.  
KONZETT, H. and R. RÖSSLER, Arch. exp. Path. Pharmac. 1940, *195*, 71.  
MANWARING, W. H., V. M. HOSEPIAN, F. J. O'NEILL and H. B. MOY, J. Immunol. 1925, *10*, 575.  
ROSENTHAL, S. R. and D. MINARD, J. Exp. Med. 1939, *70*, 415.  
SCHULTZ, W. H., J. Pharmacol. 1910, *2*, 221.  
STAUB, A. M., Ann. Inst. Pasteur 1939; *63*, 400, 485.
-



## Weitere Untersuchungen über die Farb- indikatormethode als Funktionsprobe der Blut- hirnschranke (BHS) im Tierexperiment.<sup>1</sup>

Von

TORE BROMAN.

---

In einer früheren Arbeit (1938) habe ich über die Farbindikatormethode für Untersuchungen etwaiger Schäden der Bluthirnschranken-(BHS)-Funktion berichtet. Durch eine weitere Bearbeitung dieser Probleme konnten u. a. Beweise für die Existenz der BHS erbracht werden. Diese ist als ein Permeationshindernis, das einen Zusammenhang mit den Wänden der Gefäße des ZNS hat, aufzufassen. Andere Erklärungsversuche (»die Theorie vom Mangel an Affinität«, »die Abbau-Theorie« und »die Theorie, die den spezifischen Schrankeneffekt an die einzelnen Nerven- und Gliazellmembranen verlegt«) wurden widerlegt (1940). Von Interesse für die Farbindikatormethode scheinen mir einige neue Beobachtungen, und ich will deshalb im Folgenden meine frühere Darstellung dieser Methode ergänzen, indem ich mich jetzt auf das Ergebnis von mehreren Hunderten von Tierexperimenten stützen kann.

Mit dieser Methode können gewisse Permeabilitätsschädigungen der Gefäße des ZNS entdeckt werden. Der Gang der Untersuchung ist in der Hauptsache folgender:

1) Ein Farbstoff, der unter normalen Bedingungen die BHS nicht passieren kann, wird paraneural injiziert (= ausserhalb des ZNS, z. B. intravenös oder subcutan).

2) Danach wird das Tier getötet. Die zerebralen Gefässbahnen werden dann sorgfältig reingespült bis der farbstoffhaltige Blutinhalt entfernt ist, und das Präparat fixiert werden kann.

<sup>1</sup> Eingegangen am 8. März 1941.

3) Makroskopische Untersuchung des Präparats. Für die mikroskopische Untersuchung werden innerhalb kurzer Zeit Gefrierschnitte (c:a 200  $\mu$ ) angefertigt.

Als Ergänzung hierzu kann eine Untersuchung der Piagefäße *in vivo* vorgenommen werden. Es hat sich nämlich gezeigt, dass sich die Piagefäße im Gegensatz zu den Plexusgefäßen in Bezug auf die Permeabilität genau so verhalten wie die intrazerebralen Gefäße (BROMAN 1940). Nach intravenöser Farbstoffzufuhr sieht man dann, wie der Farbstoff normalerweise intravasal bleibt, ohne dass auch nur die Gefäßwände selbst im geringsten gefärbt werden, während die Gefäße und die Grundsubstanz der Dura eine ausgesprochene Färbung annehmen. Ist jedoch ein Gefäßschaden vorhanden, so kann man direkt beobachten, wie sich die Wände der geschädigten Piagefäße zunehmend färben. Dabei werden einzelne Gefäßwandzellen intensiv gefärbt, und es kommt allmählich auch zu einer Färbung der Umgebung.

Die Untersuchung der Piagefäße *in vivo* ist aus zwei Gründen von Bedeutung. Sie zeigt nämlich einwandfrei, dass die Farbstoffpassage innerhalb geschädigter Gefäßgebiete ein vitaler Vorgang ist. Ausserdem ermöglicht sie eine genauere Untersuchung der Zirkulationsstörung, die den Permeabilitätsschaden hervorruft oder die mit ihm zusammenhängt. Hierdurch wird eine wichtige Kontrolle der Ergebnisse postmortaler, histologischer Untersuchungen gewonnen.<sup>1</sup>

### Der Farbstoffindikator.

Seit langem sind die meisten Untersuchungen über die BHS mit dem sauren, semikolloidalen Farbstoff, Trypanblau, ausgeführt worden. Jedoch wurden auch andere saure Farbstoffe, wie das mehr feindispere Bromphenolblau (SKOOG, 1937) benutzt. Die blaue Farbe ist schon deshalb geeignet, weil sie auch bei schwacher Konzentration deutlich hervortritt. Ich habe für meine Versuche beide Farbstoffe benutzt und will kurz Einiges über ihre Vor- bzw Nachteile und Wirkungen bei den verschiedenen Laboratoriumstieren mitteilen. Für Einzelheiten über die Herstellung der Farbstofflösungen und Injektionsdosen möchte ich auf meine frühere Veröffentlichung verweisen. Hier soll nur das grundsätzlich Wichtige angegeben werden.

<sup>1</sup> Über mit dieser Methode ausgeführte Untersuchungen peripherer Zirkulationsstörungen des ZNS wurde in einer früheren Arbeit berichtet (1940).

## 1) Versuche mit Trypanblau.

*Herstellung der Lösung:* Das Trypanblau wird zu 1 % in warmen Aqua dest. gelöst (ziemlich haltbare Lösung). Die Tyrodestamm-lösungen werden etwa eine Stunde vor dem Gebrauch zugesetzt. Die Fällungen werden kurz vor der Injektion abfiltriert, und die Lösung auf Körpertemperatur erwärmt. Ausserdem habe ich das Trypanblau auch direkt in physiologischer Kochsalzlösung unter Erhitzung gelöst. Nach der Abkühlung, unmittelbar vor der Injektion wurde ebenfalls filtriert und wieder auf Körpertemperatur erwärmt. Beide Lösungen waren also mit Trypanblau gesättigt. Einen Unterschied des Effekts der beiden Lösungen habe ich nicht feststellen können.

*Dosierung:* Für die intravenöse Injektion erwies sich meist eine Menge von 20—30 ccm Farbstofflösung pro kg Körpergewicht als geeignet. Die Injektionsdauer war verschieden, von 5 Minuten bis zu mehr als 1 Stunde, in der Regel aber 15 bis 45 Minuten. Zur subcutanen Injektion bei Meerschweinchen (400—600 g) benutzte ich 20—30 ccm der Farbstofflösung, die mindestens zwei Stunden vor der Tötung des Tieres verabfolgt wurden (am besten in wiederholten Injektionen in 4—12 Stunden Abstand).

Die Dosierung wurde so gewählt, dass man in einer evtl. geschädigten Region des ZNS eine deutliche Färbung erhält. Da das Trypanblau die BHS nicht einmal bei stärkster Konzentration passiert, kann das Resultat durch eine Überdosierung nicht getrübt werden. Wird eine zu grosse Farbstoffmenge zugeführt, so kann zwar der Farbstoff das Tier töten, aber zu einer Passage des Farbstoffes in ungeschädigte Teile des ZNS kommt es niemals (gerade dieses Verhalten kann sogar als Kontrolle benutzt werden).

*Toxische Wirkungen des Farbstoffes:* Die Farbstofflösung beeinflusst sowohl den Kreislauf wie die Atmung des Meerschweinchens, trotzdem sie keine mikroskopisch sichtbaren Partikeln enthält. Schon nach einer intravenösen Injektion von 1—2 ccm sinkt der Blutdruck erheblich, und die Atmung wird nach einer vorübergehenden Frequenzsteigerung häufig langsam und unregelmässig, oder hört überhaupt auf. Die Spontanatmung setzt oft nach einiger Zeit wieder ein, manchmal ist es jedoch notwendig, den ganzen weiteren Versuch mit künstlicher Atmung auszuführen. Da der arterielle Blutdruck sinkt, ohne dass der venöse eine wesentliche Veränderung zeigt, kann angenommen werden, dass die Blutdrucksenkung auf eine Schwächung des Gefässtonus und nicht des Herzens beruht (siehe Kurven in meiner früheren Veröffentlichung, 1939).

Die Blutdrucksenkung kann bewirken, dass in Gebieten, wo vorher eine Prästase vorhanden war, eine völlige Stase auftritt;

wo vorher eine relativ normale Zirkulation vorhanden war, könnte eine Prästase sich entwickeln. Ist nun die Schädigung der Permeabilität in irgend einer Weise durch den prästatischen Zustand bedingt, so kann der Farbstoff an Orten auftreten, wo primär keine Permeabilitätsschädigung vorhanden war.

Wegen der blutdrucksenkenden Wirkung ist das Trypanblau kein idealer Farbstoff für die Schrankenfunktionsprobe beim Meerschweinchen. Es gelingt zwar, wie ich früher (1939) zeigen konnte, den Blutdruck während der Farbstoffinjektion durch Einschaltung eines Druckkompensators in die Aorta auf einem konstanten, und sogar höher als in der Norm liegenden Niveau zu halten, aber hierdurch wird der Einfluss des Farbstoffs auf den Gefässtonus nicht verhindert, und man kann deshalb trotz dieser Massnahme eine Änderung der Zirkulation des ZNS nicht ausschliessen. Dazu kommt, dass die Tiere in dieser Versuchsanordnung nach einiger Zeit eine Herzschwäche bekommen, wahrscheinlich weil der Farbstoff allmählich auch toxisch auf das Herz wirkt. Ich habe gefunden, dass es günstiger ist, die Blutdrucksenkung durch eine Adrenalindauerinfusion zu kompensieren. Hierdurch gelingt es, die Tiere trotz hoher Farbstoffdosen mehr als eine Stunde lang am Leben zu erhalten. Unter Einwirkung des Farbstoffs sind grosse Adrenalindosen erforderlich um den Gefässtonus zu steigern, es wird etwa das 10-fache der sonst üblichen Dosis benötigt (40—80  $\gamma$  pro kg Körpergewicht und Minute). Die Empfindlichkeit für Adrenalin nimmt allmählich ab, weshalb es nicht gelingt auf diese Weise für längere Zeit den Blutdruck auf einem konstanten Niveau zu halten.

Am besten wäre es, wenn man das Trypanblau durch irgend einen anderen, sauren Vitalfarbstoff, der nicht blutdrucksenkend wirkt, ersetzen könnte. Das Meerschweinchen scheint aber auch auf andere saure Farbstoffe als das Trypanblau mit einer Blutdrucksenkung zu reagieren — vgl. Bromphenolblau (siehe unten) und den Effekt des Benzoechtrosa (KAHLSON und LANDBY 1937). Untersuchungen anderer Tiere, wie Kaninchen und Katzen, haben jedoch gezeigt, dass das Trypanblau bei diesen im allgemeinen nicht blutdrucksenkend wirkt. Deshalb sollten, wenn möglich, Untersuchungen mit Trypanblau als Farbindikator bei BHS-Schäden an diesen Tieren ausgeführt, oder wenigstens kontrolliert werden. Bei derartigen Versuchen habe ich keine wesentlichen störenden Nebenwirkungen feststellen können.

## 2) Versuche mit Bromphenolblau.

Das Bromphenolblau ist ein saurer Farbstoff, der u. a. als pH-Indikator benutzt wird. Nach einer von GILDING (1932) zu einem anderen Zweck angegebenen Methode kann man durch Zusatz von Natriumchlorid und Natronlauge eine blutisotone und -isohydrische 4 % Lösung dieses Farbstoffes herstellen. Dieser Lösung bediente sich SKOOG (1937) statt der »klassischen« Trypanblaulösung bei Untersuchungen über Schädigungen der BHS des Meerschweinchens durch Injektion toxischen Serums (FORSSMAN-Serum). Bei einer Nachprüfung dieses Farbstoffes als Indikator für BHS-Schäden erwies es sich mir als notwendig, die Herstellung der Lösung etwas zu ändern, um sie frei von mikroskopisch sichtbaren Partikeln und blutisohydrisch zu machen (BROMAN 1938). Ich will jedoch hier nicht genauer auf die Zusammensetzung der Lösung und die Injektionsdosen eingehen, da es sich gezeigt hat, dass der Farbstoff ausser einigen praktischen Nachteilen auch schädlich auf die BHS-Funktion wirkt, und deshalb ungeeignet als Farbindikator dieser Funktion ist.

*Toxische Wirkungen des Farbstoffes:* Das Bromphenolblau wirkt beim Meerschweinchen ebenso auf den Blutdruck und die Atmung wie das Trypanblau. Die Blutdrucksenkung und Atemstörungen sind jedoch relativ kurzdauernd und nicht so stark. Dies ist aber der einzige Vorteil, den das Bromphenolblau vor dem Trypanblau hat.

Aus einigen Untersuchungen scheint hervorzugehen, dass feindisperse, saure Vitalfarbstoffe die BHS passieren (SPATZ; 1933, BROMAN, 1940). Im Vergleich zum Trypanblau ist Bromphenolblau relativ feindispers, und es passiert die BHS schon normalerweise, wenn auch in sehr geringer Konzentration. Beim Versuch mit Bromphenolblau pflegt man deshalb in den ungeschädigten Bezirken des ZNS, vor allem in der Rinde, eine schwach bläuliche Tönung zu finden, während die geschädigten Teile stark blau gefärbt sind. Auffallenderweise nimmt die Färbung des ZNS nicht successiv zu, wenn die zugeführte Farbstoffmenge vermehrt wird, sondern es kann bei einigen Versuchen plötzlich zu einer starken Farbstoffpassage kommen, trotzdem die Farbstoffmenge nicht grösser, oder sogar geringer war, als die, die in anderen Versuchen die schwächste Färbung des ZNS hervorgerufen hatte. Übersteigt die Blutkonzentration einen bestimmten Schwellenwert — wenn auch nur während sehr kurzer Zeit — so scheint

der Farbstoff schädlich auf die zerebralen Gefässe selbst zu wirken, sodass deren BHS-Funktion geschädigt wird, und eine kräftige Farbstoffpassage stattfinden kann. Dieses Resultat erhält man durch zu grosse oder zu schnell zugeführte Mengen.<sup>1</sup>

Nach intravenöser Farbstoffzufuhr werden dann auch die ungeschädigten Gebiete des ZNS deutlich blau gefärbt, manchmal ebenso stark wie die geschädigten, und das Resultat kann nicht beurteilt werden. Wird der Farbstoff intraarteriell, in eine der zum Zerebrum verlaufenden Arterien injiziert, so besteht ausserdem die Gefahr, dass es zu einer Farbstoffpassage in dem Verzweigungsgebiet dieser kommt trotzdem kein primärer Schaden des ZNS vorhanden war. Nach einem Vortrage Skoogs kam ich (1938) fälschlicherweise zu der Annahme, dass er diesen Weg benutzt hat. Die Unterschiede der Farbstoffausbreitung zwischen seiner und meiner Resultate nach einer Schädigung mit dem FORSSMAN-Serum müssen deshalb in anderer Weise zu erklären sein.

Wegen der Gefahr einer Überdosierung sollte das Bromphenolblau nicht als Indikator des BHS-Funktion benutzt werden. Der feindisperse und leichtdiffusible Charakter des Bromphenolblau lässt es ausserdem für Versuche ungeeignet werden, bei denen man die Farbstoffpassage im mikroskopischen Schnitt kontrollieren will. Diese entfärben sich nämlich sehr schnell, noch bevor sie entwässert werden können.

### Das Vorgehen nach der Farbstoffinjektion.

Nach einer Zeit, in der sich die schrankengeschädigte Region des ZNS gefärbt haben kann (10 Min.-1 Stunde nach Beginn der Farbstoffinjektion), wird das Tier getötet — z. B. durch Eröffnung des Thorax und Aufschneiden des Herzens. Danach werden die Gefässe des Kopfes von der Aorta aus mit Tyrodelösung durchgespült und von ihrem blau gefärbten Inhalt befreit. Dies geschieht unter einem Druck, der ungefähr dem normalen Blutdruck des Tieres entspricht. Durch die Ausspülung des Gefässinhaltes soll eine postmortale Farbstoffdiffusion in das ZNS unmöglich gemacht werden. Nach dieser Reinigung wird das ZNS auf dem Gefässwege mit konzentriertem Formol fixiert. Für die Spülung und Fixierung wurden in der Regel folgende Flüssigkeitsmengen benutzt:

<sup>1</sup> In meiner früheren Arbeit über die Farbindikatormethode habe ich fälschlich den Standpunkt vertreten, dass die Farbstoffpassage bei derartigen Versuchen auf einer bei der Injektion entstandenen »Blutdruckskrise« beruhte. Spätere Versuche, bei denen im Anschluss an die Farbstoffinjektion experimentell eine Steigerung des Arterien- und Venendruckes hervorgerufen wurde, haben gezeigt, dass hierdurch die Farbstoffpassage nicht begünstigt wird.

Meerschweinchen	50 ccm Tyrode,	. . .	100 ccm Formol	40 %.
Kaninchen	. . . 100 »	»	. . . 150 »	» » .
Katze	. . . . 200 »	»	. . . 200 »	» » .

Die histologische Untersuchung wurde an ungefärbten, in Canadabalsam eingedeckten Gefrierschnitten vorgenommen, die innerhalb  $\frac{1}{2}$  Stunde nach der Tötung des Tieres fertig gestellt waren. Natürlich kann es innerhalb dieser Zeit zu einer geringen Farbstoffdiffusion kommen, so dass das Bild demjenigen in vivo nicht genau entspricht. Grössere Veränderungen als eine Verbreiterung der perivaskulären Farbzone um das permeabilitäts-geschädigte Gefäss scheinen aber im allgemeinen nicht aufgetreten zu sein. Enthält ein Präparat trotz der postmortalen Ausspülung noch bluthaltige (= nicht völlig ausgespülte) Gefässe innerhalb einer blau gefärbten Zone, so ist ein Fehler der Technik anzunehmen und der Versuch unbrauchbar.

### Die Farbindikatormethode postmortal angewendet.

Über Untersuchungen der überlebenden BHS und evtl. Schädigungen ihrer Funktion habe ich früher berichtet (1937, 1938). Dabei konnte ich zeigen, dass das ZNS, *ebenso wie bei der Vitalfärbung des Tieres im ersten GOLDMANN'schen Versuch, ungefärbt bleibt*, wenn seine Gefässe nach dem Tode mit einer blutisotonen Farbstofflösung unter einem nicht allzu hohen Druck (ungefähr dem Blutdruck entsprechend, oder etwas geringer) via Aorta durchgespült werden. Dabei ist zu beachten, dass die Farbstofflösung nicht mikroskopisch sichtbare Partikeln enthält, oder toxisch auf die überlebenden Gefässe wirkt. Die zerebralen Gefässe werden natürlich, wie im Vitalversuch später reingespült.

Bei meinen Versuchen bediente ich mich in der Regel 100—200 ccm einer Trypanblaulösung in Gummityrode, die nach der zur Vitalfärbung angegebenen Methode hergestellt wurde (also einer gesättigten Trypanblaulösung in Gummityrode). Trotz der hohen Konzentration, in der das Trypanblau hier dem ZNS zugeführt wird, da die Lösung ohne mit Blut verdünnt zu sein die Hirngefässe direkt durchspült, war keine Farbstoffpassage in die ungeschädigten Bezirke des ZNS zu beobachten.

Auch die Bromphenolblaulösung wurde in dieser Weise geprüft. Die für die Vitalversuche benutzte 4 %-ige Konzentration erwies sich jedoch als zu stark und musste auf 0.2 % erniedrigt werden. Werden höhere Konzentrationen angewandt, so färbt sich das ganze ZNS, wie bei den Vitalversuchen mit zu grossen Dosen oder zu rascher Injektion.

Im allgemeinen genügte eine postmortale Perfusion von 5—10 Minuten um eine prägnante und im grossen Ganzen selektive Färbung einer z. B. toxisch oder embolisch schrankengeschädigten Region hervorzurufen. Der Perfusionslösung wurde Gummi arabicum zugesetzt, um einen kolloidosmotischen Druck zu erzeugen, der die Entstehung eines Hirnödems oder abnorm gesteigerter Liquorproduktion verhindert. Beide Faktoren können nämlich eine so starke Druckerhöhung in der Schädelhöhle erzeugen, dass die Hirngefässe komprimiert, und die weitere Perfusion und besonders die Nachspülung unmöglich gemacht werden. Kurzdauernde Versuche gelingen jedoch häufig auch mit Farbstofflösungen ohne Gummi arabicum.

Die Gefahr einer intrakraniellen Drucksteigerung ist natürlich bei vorher trepanierten Tieren ausgeschaltet. Bei diesen kann man makroskopisch sehen, wie sich alle Organe — auch das ZNS — während der Perfusion blau färben, wie aber die Farbe aus dem ungeschädigten ZNS verschwindet, sobald die Gefässe reingespült werden und wie, nur die übrigen Gewebe blau bleiben. Mikroskopisch befindet sich auch die Farbe während der Durchspülung intravasal, und zu einer Farbstoffpassage in das Gewebe kommt es nur bei Schädigungen des ZNS.

Da die effektivsten Schrankenläsionen bei meinen Versuchen unter den toxischen Schädigungen, vor allem durch das FORSSMANSche Serum, zu finden waren, wurden die meisten postmortalen Untersuchungen am Meerschweinchen ausgeführt, dessen Hirn hierbei regionär geschädigt war. Dabei konnte Folgendes beobachtet werden:

Einige Zeit nach dem Tode schwillt die geschädigte Region an wie bei einem lokalem Hirnödem (schon intra vitam findet sich bei einigen Fällen ein lokales, geringes aber deutliches Hirnödem). Hierdurch werden die in diesem Gebiete befindlichen Gefässe komprimiert. Wahrscheinlich geben diese ausserdem ihren wässerigen Inhalt an das geschwollene Gewebe ab. Es entsteht eine vollständige Stase, und eine postmortale Perfusion ist unmöglich. Während man also bei einer Perfusion innerhalb von 5—10 Minuten nach dem Tode dasselbe Resultat erhält wie im Vitalversuch, d. h. eine ausgesprochene Blaufärbung der gesamten geschädigten Region des ZNS, findet man bei einer Perfusion 15—20 Minuten nach dem Tode, dass die geschädigte Region zentral farblos und unfixiert bleibt und blutkörperchenhaltige nicht ausgespülte Gefässe enthält, und dass es nur in der Peripherie des geschädigten Gebietes zu einer Farbstoffpassage gekommen ist. Wird die Perfusion erst ungefähr eine halbe Stunde nach dem Tode ausgeführt, so erhält man fast überhaupt keine Farbstoffpassage, aber ein Ödem des ganzen geschädigten Bezirkes (mit blutkörperchenhaltigen Gefässen und fehlender Fixierung). Nach noch längerer Zeit als  $\frac{1}{2}$  Stunde ist die Perfusion auch innerhalb der intakten Gebiete des ZNS erschwert, und man kann vereinzelt undeutliche Farbstoffpassagen bei Gefässen des vorher ungeschädigten ZNS beobachten. Eine deutliche Farbstoffpassage tritt jedoch niemals unter postmortalen Bedingungen innerhalb ungeschädigter Bezirke des ZNS auf. Dies beruht offenbar darauf, dass eine Perfusion überhaupt unmöglich wird, wenn die postmortalen Veränderungen genügend ausgeprägt sind.



## Baroceptive Impulses in the Carotid Sinus and Their Relation to the Pressure Reflex.<sup>1</sup>

By

U. S. v. EULER, G. LILJESTRAND and Y. ZOTTERMAN.

(With 5 figures in the text.)

---

The electroneurogram of the carotid sinus nerve of the cat generally exhibits two more or less distinct kinds of impulses during spontaneous respiration, viz. groups of large spikes at each systole and smaller continuous impulses between these groups. It has been generally assumed that the reflex lowering of the systemic blood pressure elicited by stimulation of the pressor receptors is due to impulses of the former kind, whereas the small impulses convey chemical stimuli (BRONK and STELLA, 1932, HEYMANS and RIJLANT, 1933, BOGUE and STELLA, 1934, ZOTTERMAN, 1935). Though there is no doubt that these big axone spikes are derived from stimulation of pressure receptors, since their frequency is closely related to the intra-carotid pressure, no definite proof has been given that they are alone responsible for the reflex effect on the general blood pressure. Certain observations with regard to the behaviour of the axone spikes in relation to the blood pressure and to the effect of certain drugs led us to question this assumption.

Evidence has been produced to show that the fibres conveying chemical impulses in the sinus nerve with a reflex action on respiration have a synaptic transmission within the sinus region, presumably in the carotid body (EULER, LILJESTRAND and ZOTTERMAN, 1939, 1941). This conception is chiefly based on the fact that

---

<sup>1</sup> Received 28 December 1940.

Die postmortale Untersuchungsmethode ist theoretisch von besonderem Interesse — vgl. Beweise der Existenz einer BHS (BROMAN, 1940). Aber auch für andere Fragestellungen kann sie von Bedeutung werden. So hat sich gezeigt, dass die Hirngefäße postmortal mit dem FORSSMANSCHEN Serum geschädigt werden können, wenn das Tier mit Meerschweinchenblut perfundiert wird, nicht aber, wenn man statt dessen Tyrode benutzt. Die Methode kann vielleicht auch praktische Bedeutung gewinnen, da sie die Untersuchung menschlichen Materials ermöglicht. Wird nämlich die Obduktion schnell genug nach dem Tode ausgeführt, so kann ein evtl. BHS-Schaden durch Perfusion des Gehirns mit einer Farbstofflösung nachgewiesen werden. Leider habe ich, wegen der Schwierigkeit, menschliches Material so schnell nach dem Tode zu erhalten, noch keine derartige Untersuchung ausführen können.

### Summary.

#### Further Investigations on the Colour Indicator Method as a Functional Test in Animal Experiments on the Blood-Brain-Barrier.

The present work is a supplementary continuation of a previously published paper »Über die Farbindikatormethode als tierexperimentelle Funktionsprobe des Bluthirnschrankensystems« (BROMAN, 1938). The method described is intended to show by means of animal experiments the impairment of the function of permeability occurring in the cerebral vessels. This function of permeability is characterised by a barrier effect — the so-called blood-brain-barrier — an obstacle to the passage of certain crystalloids from the blood into the CNS, most easily discernible with the aid of acid, subcolloidal vital stains, such as trypan blue. It has already been shown (BROMAN, 1940) that this barrier effect is to be ascribed to the cerebral vessels themselves and is not due to other circumstances.

The principle of the method is briefly:

- 1) A sufficient quantity of the dye (trypan blue) is injected into the blood stream and is allowed to act for a sufficiently long period.
- 2) The animal is killed and all stained blood is carefully washed out of the cranial vascular channel before fixation.
- 3) After fixation, thick, frozen sections are quickly cut for microscopic examination.

This method of examination may be conveniently supplemented by examinations of the pial vessels *in vivo*, for as far as permeability is concerned these vessels behave in the same manner as the intracerebrospinal vessels (BROMAN, 1940).

Undamaged vessels remain completely uncoloured (provided the contents of the vessels have been thoroughly washed out), as also the surrounding nervous tissue.

Certain dyes appear to be unsuitable for use in these examinations owing to their having a toxic effect on the cerebral vessels themselves (e. g. bromphenol blue). Guinea-pigs react with a certain vascular and respiratory paralysis, and are therefore less suitable as experimental animals in these tests. It is therefore better to use rabbits and cats.

The effect of the blood-brain-barrier is also demonstrable in a newly killed animal in the form of a surviving vascular function. This makes it possible to carry out examinations of any possible impairment of the permeability of the cerebrospinal vessels by means of a perfusion of dye performed shortly after death.

#### Literaturverzeichnis.

- BROMAN, T., Skand. Arch. Physiol. 1937. 77. 19; 1938, 80. 89.  
—, Acta psych. neurol. 1939. 14. 395.  
—, Acta pathol. et microbiol. 1940. Suppl. 42.  
FORSSMAN, J., Biochem. Z. 1920, 110.  
GILDING, H. P., J. Physiol. 1932. 74. 34.  
KAHLSON, G. und E. LANDBY, Skand. Arch. Physiol. 1937. 77. 301.  
SKOOG, T., Acta otolaryng., Stockh. 1937. 25. 365.  
SPATZ, H., Arch. Psychiat. 1933. 101. 267.
-

## Isolation of Colour-Sensitive Elements in a Mammalian Retina.<sup>1</sup>

By

RAGNAR GRANIT.

---

Since the days of SCHULTZE's classical work (1866) the rat's eye has been known to contain chiefly rods and a limited number of cones. From later contributions to this question based on differences between rod and cone nuclei it appears that the rods may outnumber the cones in a relation of 99: 1 (MENNER, 1928). Very accurate figures cannot be obtained, probably because the cones themselves are very small and for this reason apt to be overlooked. But WALLS (1934) has shown very definitely that there *are* cones in the rat's eye.

Nevertheless I was surprised to discover in this retina an easily demonstrable "red" receptor coupled with a "green" one. Together they gave a spectral distribution curve of sensitivity which probably illustrates elementary principles of colour reception in a retina built less for this purpose than in order to integrate the weak stimuli of dusk and night vision. From many points of view the simple structure of this system offers analytical advantages. The results have been obtained with the microelectrode technique applied in the manner described by GRANIT and SVAETICHIN (1939).

### Technique and Procedure.

The physical equipment, consisting of micro-electrode, amplifier, cathode ray oscillograph, spectrum controlled with respect to energy, and wedge of known transmission in the different wave-

---

<sup>1</sup> Received 25 February 1941.

lengths in order to reduce the energy of the stimulus, has been described in detail elsewhere (GRANIT and SVAETICHIN, 1939) together with other aspects of the technique. Suffice it to mention that spikes of activity in response to onset or cessation of illumination are recorded photographically and listened to in a loudspeaker. The amount of energy for a threshold effect or for cessation of "flicker" of an intermittent stimulus is determined under repeated checking of the level of sensitivity of the preparation. Depending upon the nature of the experiment this is done either by running a regularly returning calibration wave-length and interpolating with reference to this calibration or else by light-adapting the preparation and following the recovery (dark adaptation) curves for a number of wave-lengths from which visibility curves then can be constructed.

The rats (all albinos) are anaesthetized with chloralose-urethane or urethane alone and tracheotomized. Some 10 animals received dial. Before this they have been in the dark for not less than two hours. The cornea is cut away in red light and, when afterwards the lens is gently pressed out from the bulb, there follows with it the greater part of the vitreous body. The eye gradually fills itself with a serous fluid containing more or less blood but probably never quite free from traces of blood.

### Sources of Error.

As soon as the micro-electrode, inserted under a binocular preparation microscope, touches the retina, spontaneous firing is heard in the loudspeaker. The animals anaesthetized with dial were particularly prone to give a resting discharge of troublesome magnitude, interfering with the measurements. The reason for this almost certainly was disturbed breathing. Indeed, the retina could serve as a model of how a respiratory centre reacts to carbon dioxide. Dyspnoe is accompanied by a heavy spontaneous discharge, and, if the rat dies during the experiment, there is a roar of impulses from the loudspeaker, before complete silence signals cessation of function. Some of them may be extraretinal spikes. The retina is very sensitive to the oxygen supply and becomes silent long before the animal can be said to be dead. Increased secretion in the respiratory ducts or changes in the rate or efficiency of the respiratory mechanism for other reasons are immediately mirrored in the general level of sensitivity of the

preparation. It is important therefore to be on one's guard with respect to such sources of error and repeatedly to insert the reference wave-length as a check on the stability of the experimental conditions.

There is also a normal rotation of activity (GRANIT and SVAETICHIN, 1939, GRANIT, 1941) to be kept in check by similar means. Extra-retinal spikes are often noted but with some experience they can be recognized and, in most cases, even avoided.

Quite good and stable preparations are obtained from time to time, though relatively rarely animals lacking spontaneous discharge. If a silent spot is found in a normally active retina, it either begins to fire later in the experiment or else there are other spots in the same eye which discharge spontaneously. The threshold in most experiments has therefore been a just perceptible acceleration of an already present discharge. By running the grid of the loudspeaker valve at the bend of its characteristic curve the baseline noise is reduced to subthreshold intensity and the much larger spikes are thus sharpened by contrast to enable precise determination of the threshold.

## Results.

### Types of Discharge.

We owe to HARTLINE (1938) the first description of the different types of discharge obtained from single fibres, in his case from the frog's optic nerve. These types of discharge can all be seen also with the micro-electrode technique, and all of them I have actually seen in the rat's eye. Thus in fig. 2 there is an element which merely reacts with an off-effect, each time inhibited by re-illumination. Fig. 1 illustrates an "on"- "off" element having a slow spontaneous discharge which is accelerated at "on" or "off". The same element is responding to intermittent light in the lower curve. Re-illumination promptly inhibited the off-discharge. The response of the large active unit of fig. 3 is a pure "on"-discharge stopping at cessation of illumination but spontaneously firing in the intervals between the periods of illumination.

Finally there is the very interesting type of discharge illustrated in fig. 4, the two upper curves being from the eye of a white mouse. This is a very slowly adapting receptor reacting all the time during

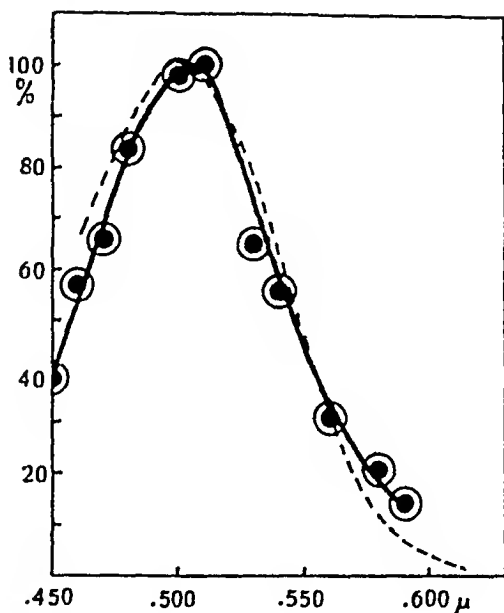
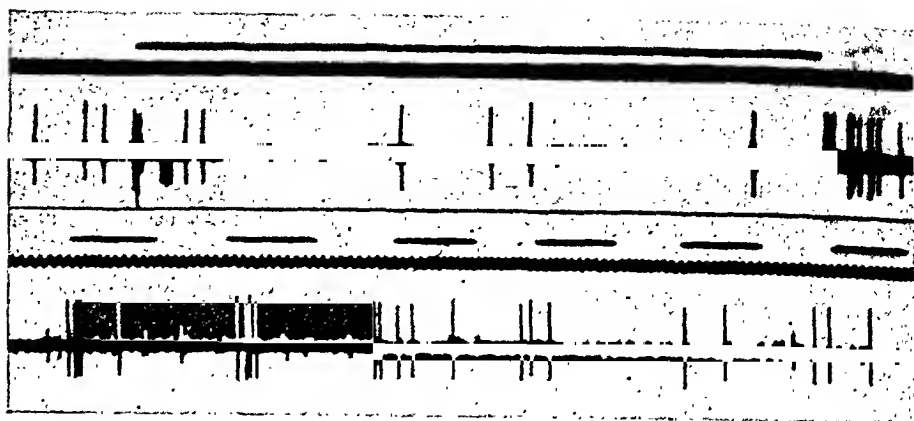


Fig. 1. *Above:* Single unit of rat's eye reacting to onset and cessation of illumination with rapid acceleration of spontaneous discharge. In the lower curve the same unit responds to "flicker". Light signal uppermost in all records. Immediately below it time in  $1/50$  sec. in this and all records. *Below:* Distribution of sensitivity to spectral light of the isolated unit illustrated above. The index was cessation of "flicker". The broken lines are tracing LYTHGOE'S (1937) absorption curve for visual purple.

illumination and followed at "off" by a silent period after which there is a gradually subsiding after-discharge. This type of firing is known from other sense organs. But it is a particularly interesting member of the retinal family of typical responses on account of the fact, shown in the same figure, that the after-discharge could not be inhibited by re-illumination. On-off-responses as

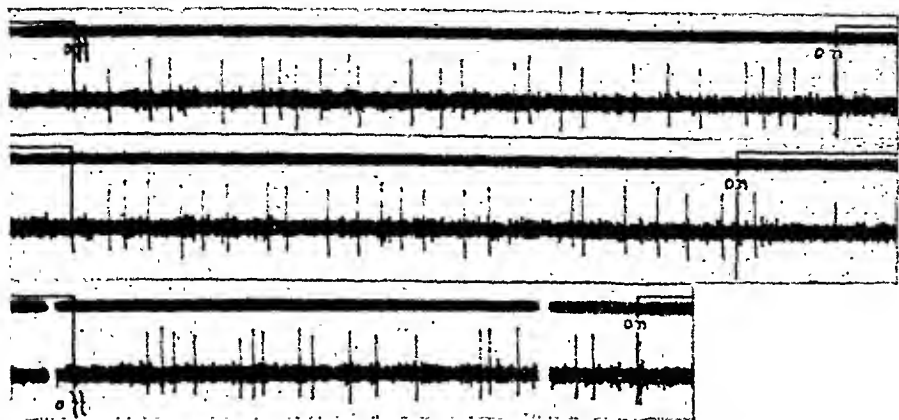


Fig. 2. A unit reaction merely to cessation of illumination and inhibited by re-illumination, which follows after an interval, shortening from above downwards. Its high threshold necessitated use of the microscope lamp (2.400 m. c.). No spontaneous discharge.

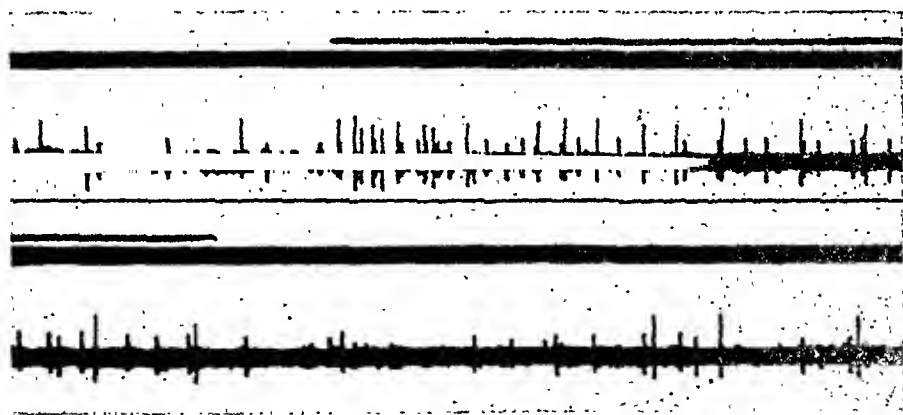


Fig. 3. Some spontaneous discharge preceding and following the activity of units merely reacting to the onset of illumination and lacking a definite after-discharge. The lower curve follows in direct continuation of the upper one and shows cessation of illumination.

well as pure off-responses are in my experience always coupled with complete inhibition upon re-illumination. For this reason it would seem natural to reserve the term "off-effect" for the type of discharge that is greatly accelerated at cessation of illumination and promptly inhibited by re-illumination. The term "after-discharge" should be used for the impulses following cessation of illumination with or without a silent period.

In the optic nerve of the horse-shoe crab (*Limulus*) HARTLINE and GRAHAM (1932) first found an element reacting with a



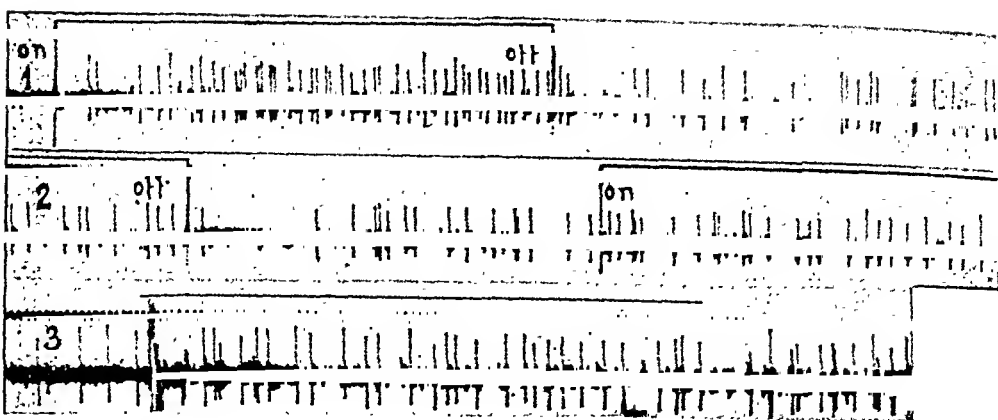


Fig. 4. Curves 1 and 2 refer to the retina of a white mouse and stimulation with the microscope lamp (2.400 m. c.). No spontaneous rhythm but a long after-discharge which is *not* inhibited by re-illumination (curve 2). Curve 3 illustrates a similar type of response from the retina of a rat.

rapid initial discharge followed by a silent period after which the discharge was resumed at a slower rate during illumination. This type of response I have also seen in the rat's eye.

I have not made any systematic observations on the relative distribution of the frequency with which the different types occur. But a comparison with the results obtained during long experience with the frog's mixed retina leads to the general conclusion that elements reacting *during* illumination are less common in the frog's eye where the great majority of types merely respond at the onset and (or) cessation of illumination. I have never seen an element with a non-inhabitable after-discharge preceded by a silent period (fig. 4) until this work with mammals was taken up. They must therefore be rare in the frog's retina. Pure off-elements, on the other hand, are far more common in frogs than in rats.

These observations may account for the fact that the frog has an I-retina and the rat an E-retina, distinguished by criteria which have been enumerated elsewhere (GRANIT, 1935, 1938, CHARPENTIER, 1936). Thus the E-retinae have a smaller off-effect in their electroretinograms than the I-retinae and this may signify a lesser degree of utilization of inhibition, as already suggested at that time (1935). But, despite this, the E-retinae may have a considerable after-discharge, simulating an off-effect (in the stricter sense of the term) in the discharge from whole nerve.

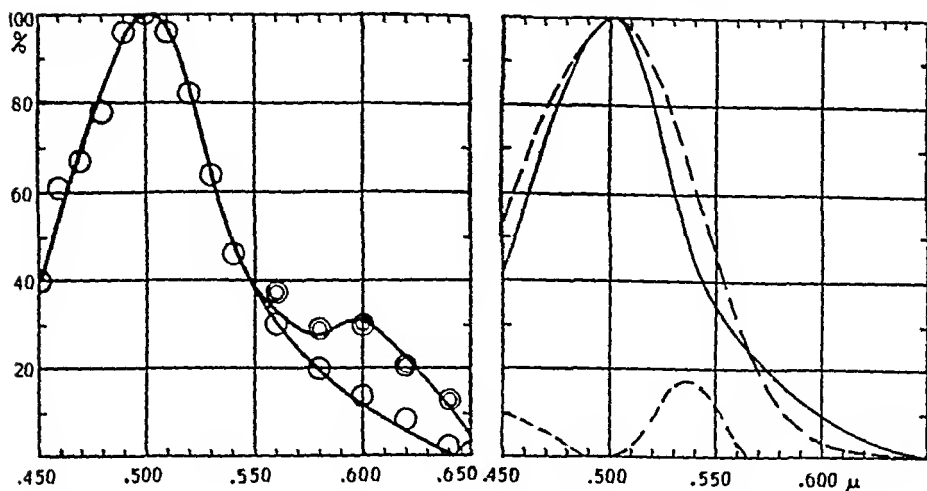


Fig. 5. Curves illustrating the average distribution of sensitivity to spectral light of 10 rats (81 averaged observations from individual experiments, based on in all 152 observations). *To the left:* Equal energy spectrum and curves drawn through the averaged data. *To the right:* The smoothed curve lacking the hump (left) replotted on the basis of an equal quantum intensity spectrum to be compared with LYTHGOE'S (1937) absorption curve for visual purple (broken lines). Below is plotted the difference between the two upper curves.

#### Distribution of Sensitivity to Monochromatic Light in Relation to the Absorption Curve for Visual Purple.

GRAHAM and RIGGS (1935) carried out some experiments with the electroretinogram as index of sensitivity which led to the conclusion that the sensitivity to monochromatic light could be explained by assuming it to be determined by visual purple.

Fig. 1 illustrates a single experiment, carried out with the on-off-element reproduced above the visibility curve, in which the values show good agreement with LYTHGOE'S (1937) absorption curve for visual purple, drawn in broken lines in the same figure. A correction from equal energy to equal quantum intensity (DARTNALL and GOODEVE, 1937) would have shifted the visibility curve a little towards the short wave-lengths.

Such results are obtained but I would not dare to state that they represent the most common finding. If the observations from 10 animals are averaged the curve to the left in fig. 5 is the result. It has seemed natural to split the values in the red end into two groups because there is often in the individual curves a hump around 0.600  $\mu$ . In their present form the curves therefore illustrate the two alternatives obtained in the individual experiments.

To the right in fig. 5 is shown a comparison with LYTHGOE'S (1937) absorption curve for visual purple. My averaged data are here corrected for equal quantum intensity. The two curves differ in a systematic fashion. Below is plotted their difference in the regions where it must have some significance, a low hump in the greenish-yellow and a second increase towards the violet. These two difference curves correspond very well with rises in the absorption spectrum of a mixture of haemoglobin and oxyhaemoglobin. Considering that traces of blood hardly can be completely avoided and always were noted, the assumption that the visibility curves have been modified by a thin haemoglobin-oxyhaemoglobin filter is more than probable.

#### Analysis of the Properties of the Light-Adapted Eye.

In order to obtain further information about the "red" element an animal with the micro-electrode inserted is light-adapted to the lamp built into the microscope (Zeiss model) which represents about 2.400 m. c. This, of course, is a strong light for an opened, pigmentless eye. After 10 min. of light-adaptation the recovery of sensitivity (dark-adaptation) to the wave-lengths shown against the recovery curves of fig. 6 (left part) is studied with brief exposures at intervals of 15 sec. Two casual observations with wave-length  $0.475 \mu$  are perhaps not very reliable. But the rest of the data follow consistent curves. The long wave-lengths are relatively more resistant to light-adaptation and their recovery curves are all of the same type. The curve for  $0.500 \mu$  (maximum for visual purple) has a second rising phase which sets in when an asymptote or perhaps even a fall has been reached by the responses to the long wave-lengths.

From these curves the moment 30 min., at the broken vertical line, is selected for the plotting of the distribution of sensitivity in per cent of the maximum just before the fast rise of the curve for wave-length  $0.500 \mu$  begins. This curve is shown to the right in fig. 6 where it is compared with the visibility curve *before* adaptation to 2.400 m. c. The large increase in the red is striking. The distribution of sensitivity of a light-adapted eye is also illustrated in fig. 7 with a greater number of points in the red. The sharp and narrow curve with a maximum in  $0.600 \mu$  is merely the "red" receptor alone, given in per cent of its own maximum instead of in per cent of the maximum at  $0.500 \mu$ . — During the

a series of substances, known to exert a typical action on inter-neuronal transmission processes, such as nicotine, lobeline, acetylcholine and potassium ions, stimulate the respiration reflexly from the carotid body. Thus acetylcholine is active in a few micrograms locally on the atropinized animal's sinus region, and no such actions on sensory receptors are known for this substance. In addition, higher concentrations of nicotine, lobeline and potassium ions suppress all the chemical impulses elicited by carbon dioxide or oxygen want and also inhibit the respiratory reflexes originating from the sinus region. During these experiments we also noticed that the blood pressure reactions changed their character and finally disappeared, as a result of the action of nicotine and other substances belonging to this group. Similar observations have been reported by *TOURNADE* and *MALMÉJAC* (1930) and recently by *PI SUÑER* and *DOMENECH-ALSINA* (1938) for the carotid sinus. The last-mentioned authors found that the sinus pressure reflexes may be suppressed by local application of nicotine in sufficient concentrations. They suggest that nicotine paralyses the barosensitive receptors. It seemed to us of interest to study the reactions of the baroreceptors against the background of the evidence brought forward for a synaptic transmission of the chemical impulses.

### Methods.

All the experiments were performed on cats, anaesthetized with chloralose (0.07 g/kg intravenously). Blood pressure was recorded from the femoral artery by means of an elastic or mercury manometer. Heparine was used as an anticoagulant. The drugs were administered either by intravenous injections through the femoral vein or locally through a cannula inserted in the external carotid or by applying cotton wool pads soaked in solutions of the drugs on the sinus region.

In the sinus perfusion experiments the same technique was employed as that described by *EULER* and *LILJESTRAND* (1937).

The electroneurograms of the sinus nerve were recorded according to the methods described in previous papers (see *EULER*, *LILJESTRAND* and *ZOTTERMAN*, 1939).

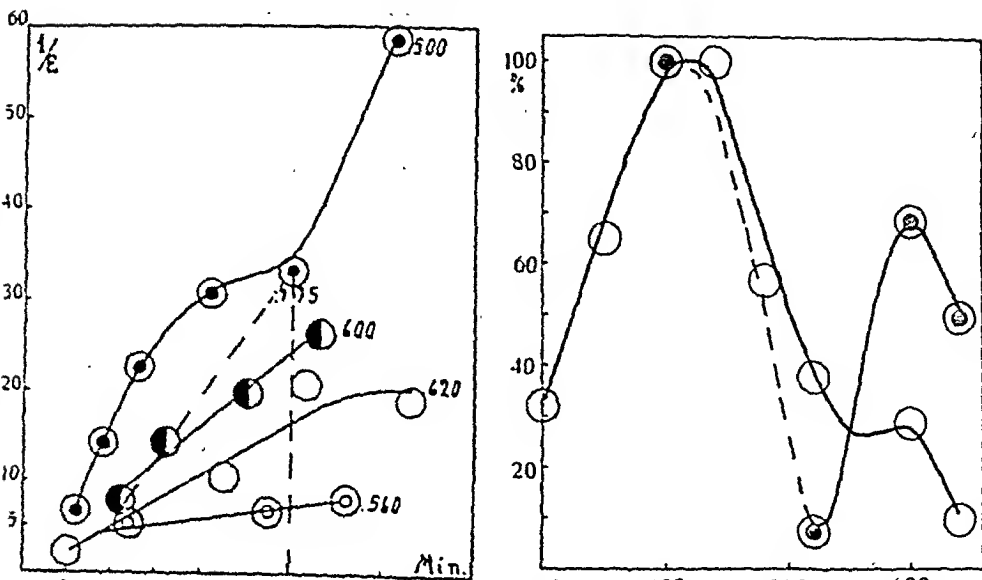


Fig. 6. *To the left:* Recovery curves for the wave-lengths indicated showing the return of sensitivity (inverse value of energy) against time, after cessation of 10 min. of light-adaptation to 2.400 m. c. *To the right:* Distribution of sensitivity to spectral light:  $\circ$  before, and  $\odot$  after light-adaptation at the moment marked the left by the vertical line through the recovery curves.

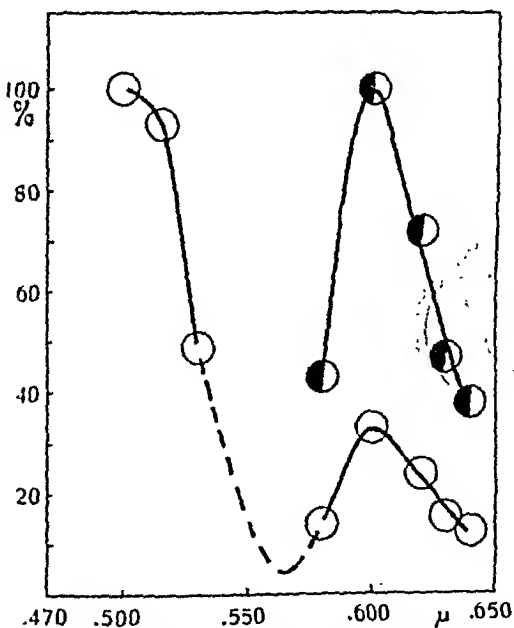


Fig. 7. Distribution of sensitivity to the equal energy spectrum after some light-adaptation to 2.400 m. c.:  $\circ$  in per cent of the maximum;  $\odot$  in per cent of the maximum for the isolated "red" element.

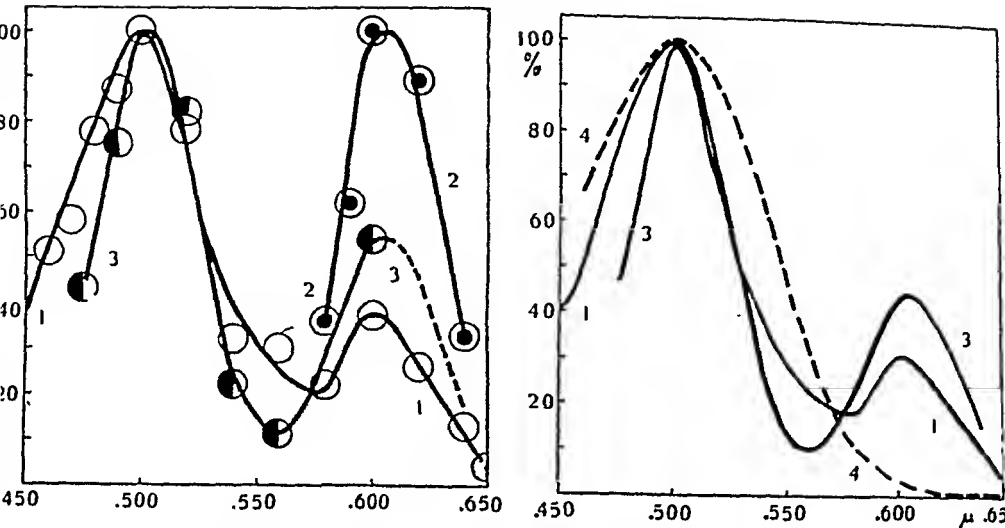


Fig. 8. *To the left:* Visibility curves of an active unit. 1 dark-adaptation, 2 immediately after light-adaptation, 3 somewhat later when the "green" substance is well above the threshold of the monochromator. *To the right:* The same curves similarly labelled corrected for an equal quantum intensity spectrum and compared with 4, the absorption curve for visual purple.

time devoted to following the recovery curves the sensitivity of the retina never returns to values near the maximal sensitivity at the beginning of the experiment, and, roughly, the level of sensitivity is about a 1 000 times below that of the completely dark-adapted animal.

Quite often it is impossible after light-adaptation to record anything but the narrow and precise "red" curve together with the top of the "green" one, because there is not enough energy in the monochromator to enable the intermediate low values to be measured. With some animals the red end may be seen in the isolated state. The reason for this also is that during light-adaptation the "green" substance becomes so insensitive that the energy of the monochromator does not suffice to elicit a "green" response. But the latter always returns during the early phase of dark-adaptation. And it always returns along a two-step curve.

The experiment of fig. 8 (left part) was of particular interest because to all appearance the same unit was followed all the time and complete curves were obtained for both the dark- and the light-adapted states. Despite 30 hours of previous dark-adaptation of the rat this unit gave the hump in the red already from the beginning (curve 1). The "green" curve was unusually narrow. After light-adaptation responses were first obtained only from the

red end. The rest of the spectrum was subthreshold. Thus, without further difficulties, the "red" substance was obtained in the isolated state (curve 2). Then the "green" substance gradually rose above the threshold, as shown by the recovery curves for the wave-lengths 0.600 and 0.500  $\mu$  in fig. 9, referring to the same experiment. A certain later stage in this recovery process is shown by curve 3 of fig. 8 (left). It is the moment when the "red" is about 50 % of the "green".

The characteristic and regularly recurring properties of the "red" substance are thus: (i) maximum around 0.600  $\mu$ , (ii) steep descent of the visibility curve towards either side, particularly towards the yellow and (iii) the important fact that it always appears coupled with the "green" substance and (iv) that it is more resistant to light-adaptation than the latter. At the moment it also seems probable that (v) the "red" and "green" receptors are coupled to the same final common path. To this question I shall return below.

To the right in fig. 8 some of the curves of the left half are plotted after having been corrected for equal quantum intensity. LYTHGOE'S absorption curve for visual purple is inserted for comparison. The "green" curve is narrow already in the dark-adapted state and becomes still narrower after light-adaptation. There is no definite reason to assume that the haemoglobin-oxyhaemoglobin filter had become increased in thickness during light-adaptation.

### Is the "Green" Substance Identical with Visual Purple?

As is well known visual purple changes a great deal in concentration with state of adaptation, and this process has recently been followed quantitatively by ZEWI (1939). How this factor affects the visibility curves in my experiments depends upon the unknown concentration in the living retina but also upon its manner of distribution. If the outer limbs of the rods could be treated as a model absorption trough, then a decrease in the concentration, owing to light-adaptation, would lead to a decrease in the width of the curves. But LYTHGOE (BAYLISS, LYTHGOE and TANSLEY, 1936, LYTHGOE, 1940) and GRANIT (GRANIT ET AL., 1938, 1939) have given reasons for believing that the formation of a surface film of visual purple is an essential factor in the sensitization of the eye during dark-adaptation. An over-simplified physical scheme may therefore not be applicable to this case.

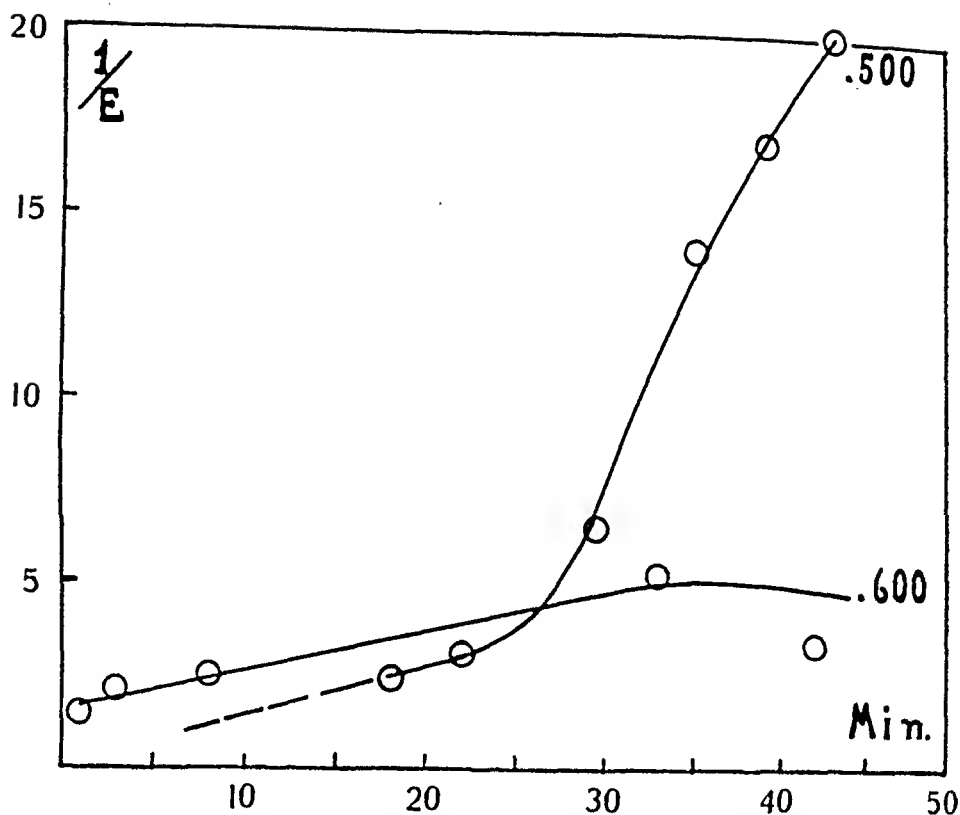


Fig. 9. Shows recovery of sensitivity as in fig. 6 for the wave-lengths 0.500 and 0.600  $\mu$  in the experiment analyzed in fig. 8 with regard to the distribution of sensitivity.

But the experiments themselves have disclosed a fact which in this connexion would seem to be of significance. This is the two-step rise of the recovery curves for wave-length 0.500  $\mu$ . Also with the less discriminative retinal response an initial slow rise in followed by a later fast increase in the sensitivity of the eye (WREDE, 1937; RIGGS, 1937; GRANIT ET AL. 1938, 1939), demonstrated with frogs. The initial slow phase in the regeneration at wave-length 0.500  $\mu$  represents the time taken up by the so-called "intermediate process" of GRANIT ET AL. We suggested that during this time some chemical organization of the visual purple molecule in relation to the cell took place, as during this early phase neither the sensitivity nor other properties of the eye corresponded to what is meant by a state of dark-adaptation. The late fast phase represented dark-adaptation proper which made the visual purple "active" physiologically. LYTHGOE (1940) in discussing the work of GRANIT ET AL. (1938, 1939)



suggested that the visual purple, which was inactive from the point of view of dark-adaptation proper, nevertheless had some function to carry out, probably in connexion with photopic vision. We can see now that the "green" substance which either is visual purple itself or a modification of it, really does take part in what is known as "cone vision", but correctly should be termed daylight or photopic vision. This result could only be obtained with the discriminative micro-electrode technique used above.

It is regrettable that the as such highly convenient plot of log threshold against time for the process of dark-adaptation should have come to acquire some theoretical significance (НЕЧТ, 1923) on account of the superficial likeness of this curve to the bimolecular isotherm supposed to represent visual purple regeneration. From the theoretical point of view much the better plot is the one used above, inverse value of energy necessary for the threshold, against time, which also enables comparison with the absorption curve for visual purple. The simple, less sensitive, but very useful method of measuring size of the electroretinogram during dark-adaptation in combination with simultaneous measurements of the concentration of visual purple in similarly treated control eyes (GRANT ET AL., 1938, 1939) showed that the size of the electroretinogram bore no simple relation to the amount of visual purple. And yet the electroretinogram must measure sensitivity to light even though the relation is not one of direct proportionality (GRANT, 1938). Moderate light-adaptation greatly diminished the size of the electroretinogram without reducing the concentration of visual purple of a well dark-adapted eye. On the other hand, the light-adapted eye did not become sensitive in proportion to the rise of the concentration of visual purple during dark-adaptation. Not until the concentration had reached a relatively high value did a fast rise of sensitivity (dark-adaptation proper) set in. But before that something took place in the eye. And it was this period that we ascribed to the time needed for an "intermediate process" preceding the sensitization of the retina. That the chemistry of regeneration of the visual purple molecule, and perhaps the molecule itself, is different during this phase is suggested by the slow rise of the recovery curve.

### Some Difficulties for the Duplicity Theory.

In fig. 10 I have illustrated the probable place of the micro-electrode, including the assumption that the few cones are of the kind that share the final common paths with the rods (POLYAK, 1936). Many facts indicate that the micro-electrode picks up the discharge from the final common path (GRANT, 1941), among them also the high degree of isolation that sometimes is obtained with it (see the illustrations of typical responses).

It is clear that the well-known assumptions of the duplicity theory that the rods cease to function in daylight vision, and that they are colour blind, will find it difficult to survive these experiments. One could perhaps ascribe the "red" substance which, after all, also may be a modification of the visual purple molecule, to the few cones present in the rat's retina. But only a desire to save a dogma could lead to the hypothesis that the "green" substance of the light-adapted rat's eye is a cone substance. Every-

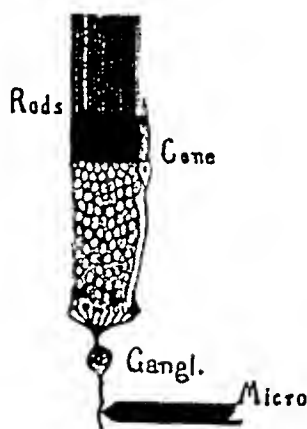


Fig. 10. Schematic drawing (lacking bipolars and amacrine) illustrating the probable locus of the micro-electrode with regard to a receptive unit consisting of several rods and a single cone connected to the same final common path. The cone is a little too large. The diameter of the very slender and elongated rods is  $0.75 \mu$  (SCHULTZE, 1866).

thing points to the fact that visual purple, probably in a slightly modified state, is active also in the light-adapted state and in the same elements.

Most curious is the fact that the experiments show the same active unit to give the visibility curve with the two maxima in red and green. Before definitely accepting this fact one would like to be able to support it with a greater number of experiments, also with other animals. It is, of course, of prime importance from the theoretical point of view. But even if further experiments should show that the "red" and "green" substances were coupled to different neurites with very similar spikes, there is no escape from the fact that they must be closely connected in order to account for their always being together.

### Colour Vision in Rats.

Do the rats see colours? Experiments by WALTON (1933) suggest that they can learn to discriminate the red and green parts of the spectrum from each other. It would seem difficult to accept other conclusions drawn from his experiments as filters were used and only the red end was relatively pure. Seeing how narrow the sensitivity bands may be one must emphasize this point of view, especially with regard to further experimentation with training methods. The ideal procedure would be to locate the sensitivity bands of different animals with the micro-electrode technique and then try to find out whether the animal utilizes the particular peripheral mechanism of discrimination found. From the point of view of the properties of the latter, however, the second task is of no immediate interest.

The mechanism of colour reception of the rat's retina is probably of a very elementary type. Thus, for instance, in the frog's retina the region of low sensitivity between red and green is filled out and possesses a maximum in  $0.560 \mu$ , covering the region where the rat has its minimum. In fact, the frog's photopic spectrum is almost identical with the human one, but frogs may have a more prominent "blue" receptor (GRANT and SVAETICHIN, 1939). Despite this, the properties of the peripheral mechanism of the rat's eye in many ways throw more light upon the nature of the peripheral mechanism in relation to vision. But some caution is suggested by the circumstance that the micro-electrode technique is selective in the sense that it chooses the most common case, even when one is careful not to restrict one's observations to isolated elements. If there are other substances or combinations in the rat's eye they must be very rare or insensitive in comparison with the one described above, but one cannot now assert that the rat only possesses the red-green mechanism described in this paper.

### Summary.

Micro-electrode, amplifier and cathode ray oscillograph have been used for the recording of "spikes" from restricted units in the retina of anaesthetized albino rats in response to monochromatic light of known energy content.

A description of the types of discharge seen in isolated elements is given on p. 95.

The main problem has been to study the distribution of sensitivity to monochromatic light of more or less restricted units.

In the dark-adapted state their visibility curves often correspond very well with LYTHGÖE'S absorption curve for visual purple. But some of them have an additional lower maximum around  $0.600 \mu$ .

In such cases good light-adaptation suppresses the green part of the spectrum relatively more and there may remain above the threshold of the monochromator only the red-sensitive part, which in the isolated state still has its maximum around  $0.600 \mu$ , descends steeply towards the yellow and less steeply towards the longer wave-lengths (figg. 6—8).

The "red" and the "green" element recover from light-adaptation along slowly rising curves, the "green" one probably somewhat faster so that at a certain stage of light-adaptation both are present giving a characteristic visibility curve with two maxima around respectively  $0.500$  and  $0.600 \mu$  (fig. 8). But after a time, depending upon the previous period of light-adaptation, the "green" element begins to recover from light-adaptation at a very much faster rate than previously (dark-adaptation proper).

In the initial stages of light-adaptation the "green" substance often has a narrower visibility curve than is suggested by the properties of visual purple. This in connexion with its slow initial rate of regeneration has led to the suggestion that it is not visual purple itself but a slightly modified visual purple molecule. On the other hand, a haemoglobin-oxyhaemoglobinfilter, due to blood in the bulb, can be shown to affect the curve for the "green" substance in such a manner as to make it narrower.

The "red" and "green" elements are always coupled, and, though not conclusive on this point, the evidence at present suggests that the two elements are connected to the same fibre in the optic nerve.

It is suggested that the red-green system of the rat's retina represents the prototype of such systems in mammalian retinae.

The experiments have been carried out with the support of a grant from The Rockefeller Foundation to this laboratory.

## References.

- BAYLISS, L. E., R. J. LYTHGOE and K. TANSLEY, Proc. Roy. Soc. B. 1936. *120*. 95.
- CHARPENTIER, G., Acta Ophthal. Kbh, 1936. Suppl. 9.
- DARTNALL, H. J. A. and C. F. GOODEVE, Nature, Lond. 1937. *139*. 490.
- GRAHAM, C. H. and L. A. RIGGS, J. gen. Psychol. 1935. *12*. 279.
- GRANIT, R., J. Physiol. 1935. *85*. 421.
- , Documenta Ophthal. 1938. *1*. 7.
- , This Journal, 1941. *1*. 370.
- , T. HOLMBERG and M. ZEWI, J. Physiol. 1938. *94*. 430.
- , A. MUNSTERHJELM and M. ZEWI, J. Physiol. 1939. *96*. 31.
- , and G. SVAETICHIN, Upsala Läkaref. Förhandl. N. F. 1939. *45*. 161.
- HARTLINE, H. K., Amer. J. Physiol. 1938. *121*. 400.
- , and C. H. GRAHAM, J. Cell. Comp. Physiol. 1932. *1*. 277.
- HECHT, S., J. gen. Physiol. 1920. *2*. 499.
- LYTHGOE, R. J., J. Physiol. 1937. *89*. 331.
- , Brit. J. Ophthal. 1940. *24*. 21.
- MENNER, E., Z. vergl. Physiol. 1928. *8*. 761.
- POLYAK, S., Arch. Ophthal. N. Y. 1936. *15*. 477.
- RIGGS, L. A., J. Cell. Comp. Physiol. 1937. *9*. 491.
- SCHULTZE, M., Arch. mikr. Anat. 1866. *2*. 175.
- WALLS, G. L., J. Comp. Psychol. 1934. *18*. 363.
- WALTON, W. E., J. Comp. Psychol. 1933. *15*. 359, 373.
- WREDE, C. M., Skand. Arch. Physiol. 1937. *77*. Proc. Nord. Physiol. Soc.
- ZEWI, M., Acta Soc. Sci. Fenn. N. S. B. 1939. *2*. N:o 4.

From the Department of Physiology, University of Lund.

## Blood Histamine in Reactive Hyperaemia and in Muscle Tetanus.<sup>1</sup>

By

N. EMMELIN, G. KAHLSON and F. WICKSELL.

---

Experimental evidence supports the view that the dilatation of the small vessels in a tissue rendered ischaemic by occlusion of the blood flow and in tetanized muscles is due at least partly to chemical substances. LEWIS and GRANT (1925) concluded from experiments on the human forearm that the reactive hyperaemia is due to substances accumulated in the tissue during the period of obstructed circulation. LEWIS (1927) introduced the term H-substance for this unidentified vasodilator substance and suggested its identity with histamine. BARSOU and GADDUM (1935), estimating the histamine content of blood from the dog's hind limb before and after occlusion of the circulation, found that the venous blood from the limb contains an increased amount of histamine during the period of hyperaemia. BARSOU and SMIRK (1936) studied the histamine content in plasma from the human arm in reactive hyperaemia after complete obstruction of the circulation and found a significant increase in the histamine concentration in the venous plasma during the hyperaemia. In experiments on anesthetized dogs ANREP and BARSOU (1935) found an increase in the histamine concentration of the venous blood emerging from a resting skeletal muscle when the blood supply to the muscle was diminished.

In the course of their experiments ANREP and BARSOU estimated the histamine concentration of the venous blood emerging from tetanized muscles. In their experiments muscular con-

---

<sup>1</sup> Received 24 March 1941.

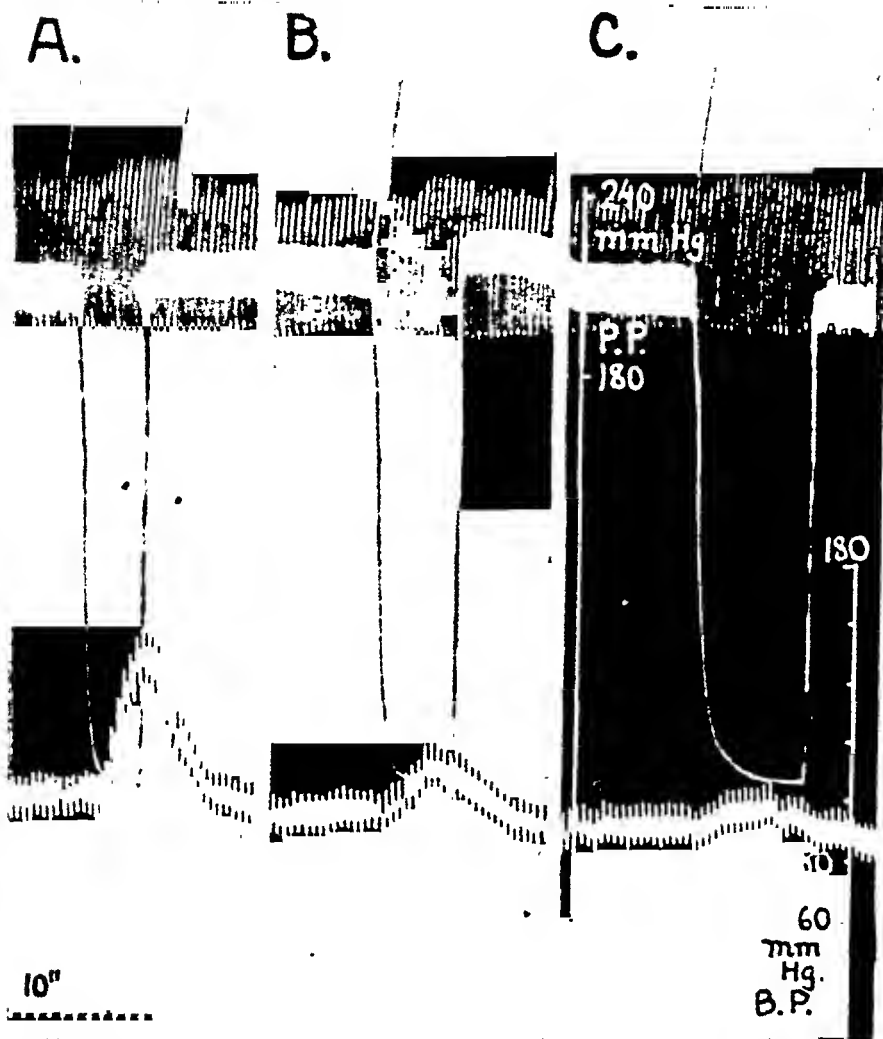


Fig. 1. Cat, chloralose. Right sinus region perfused, left sinus denervated. Curves from above: respiration, perfusion pressure, blood pressure from femoral artery, time 10 sec. A. 2 min after addition of lobeline hydrochloride to a concentration of 1:50,000, B and C, 8 and 18 min later.

## Results.

### I. Effect of Lobeline and Nicotine on the Sinus Pressure Reflex.

When lobeline was added to the perfusion fluid in experiments where the isolated sinus region of the cat was perfused, so as to give a concentration of about 1 in 2—300,000, insignificant changes only appeared in the systemic blood pressure of the animal

traction was accompanied by a large increase of the histamine concentration in the venous blood. A maximal tetanus of a dog's gastrocnemius during 10 sec. led to an excess histamine output of about 3.5  $\gamma$  as compared with the histamine content of the inflowing arterial blood. The excess histamine calculated per minute of contraction per gram of muscle was in their experiments about 0.45  $\gamma$ . Stimulation of vasomotor nerves did not lead to an excess output of histamine. ANREP, BARSOUM and TALAAT (1936) also performed experiments on heart-lung preparations in dogs. Estimations of the histamine content of the arterial blood and of the coronary venous blood in these experiments showed that the cardiac muscle continuously produces histamine. According to ANREP et al. the production of histamine by the heart is increased when the heart is made to work against an increased arterial resistance, or during anoxaemia, on administration of carbon dioxide and of adrenaline. BILLINGS and MAEGRAITH (1938) studied the histamine content of blood and muscles after tying the common iliac artery in rabbits. The histamine content of the venous blood from the ischaemic limb rose to a maximum in 3—9 hours after tying the artery and fell to normal in about 12 hours. The histamine content of the ischaemic muscle 6 hours after tying the artery was found to be increased when compared with corresponding muscles from the other leg.

In order to determine whether the excess histamine appearing in venous blood from tetanized muscles is present in the plasma ANREP, BARSOUM, TALAAT and WIENINGER (1939) followed up the experiments of ANREP and BARSOUM (1935). The blood emerging from tetanized muscles was centrifuged and the plasma, without being subjected to chemical manipulations, was tested on the guinea-pig's ileum. They report that in some experiments excess histamine could be detected by this simple procedure. In one experiment of this type on the tetanized gastrocnemius, in which the arterial inflow to the muscle was controlled in order to prevent a large hyperaemia during the rhythmic tetanus the histamine content of the venous plasma was found to rise from 25  $\gamma$  per liter during rest to 90  $\gamma$  during muscular contraction. Samples of the same plasma were extracted by the method of BARSOUM and GADDUM (1935) and the histamine content was determined to 45  $\gamma$  and 130  $\gamma$  per liter respectively.

ANREP et al. (1939) also suggest that the excess histamine in the venous blood from contracting muscles originates from the



muscle. In 5 out of 9 experiments there was a definite decrease in the histamine content of muscles after prolonged tetanization. A similar result is claimed by SCHULTE (1930).

In our own experiments we mainly studied the histamine concentration in the plasma. If the vasodilatation in reactive hyperaemia and in tetanized muscles is due partly to an increased histamine content of the blood the excess histamine, in order to be physiologically active, must appear in the plasma.

## I. Experiments in Reactive Hyperaemia.

A. *The dog's ear.* The dogs were anaesthetized with chloralose injected intravenously. In order to control the blood flow through the ear and to collect the venous outflow from the ear the vena auricularis posterior was exposed, all the tributary veins carrying blood from other parts than the ear were tied and all the small veins from the ear emptying into other veins than the vena auric. posterior were also ligated. Heparine was injected to prevent clotting. A cannula was inserted in the v. auric. post. The outflowing blood was collected in graded cylinders and reperfused into a femoral vein. The blood flow through the ear was obstructed by applying a smooth clamp or by tying a thin rubber tubing at the basis of the ear. If necessary the skin was incised to permit obstruction of the ear as proximally as possible. Before obstruction and during the following reactive hyperaemia the rate of the blood flow was measured. Blood samples were collected and the histamine content of blood and plasma was estimated. Plasma was obtained by centrifuging heparinized blood. Extracts were prepared by CODE's modification of the BARSOUM-GADDUM method. The final assay was performed on the atropinized guinea pig's ileum. All figures are given in terms of histamine base. For details concerning the method of histamine estimation we refer to our previous paper. We performed experiments on the ears of 6 dogs.

Table 1 represents a typical experiment showing the rate of blood flow after releasing the obstruction and also the histamine content of the plasma. The blood flow through the ear was completely obstructed during 25 minutes. "1st minute of R. H." refers to the condition of the circulation after 25 minutes of obstructed blood flow. The weight of the dog was 14 kg, the ear weighed 30 g at the end of the experiment.

Table 1.

Condition of circulation	Rate of blood flow through the ear cc per min.	Histamine content of venous plasma $\gamma$ per liter
Normal . . . . .	6.0	11
1 st minute of R. H. . . . .	38.0	10
2 nd — , — . . . . .	12.5	—
3 rd — , — . . . . .	8.5	—
7 th — , — . . . . .	7.0	—
10 th — , — . . . . .	6.0	—

Table 2 gives the histamine content of venous blood and plasma before and during reactive hyperaemia in experiments on 6 dogs' ears.

Table 2.

Nr	Histamine in $\gamma$ per liter		Duration of obstruction in min.	Sample
	Normal	Hyperaemia		
1	10	9	20	blood
2	10	12	15	plasma
3	9	12	15	plasma
4	19	18	15	plasma
5	10	9	20	plasma
6	11	10	25	plasma

In order to obtain a maximal concentration of histamine in the venous outflow during R. H. the blood flow through the ear was in three experiments partially obstructed by operating the clamp adequately; in these experiments the partial obstruction allowed a blood flow during R. H. of about the same order as the normal one. The hyperaemic samples were collected during the first minutes after releasing the obstruction.

B. *The dog's forelimb.* The brachial vein of dogs under chloralose was exposed. The blood flow was then obstructed by tying a rubber tubing above the elbow. A cannula was inserted into the vein and venous blood collected during the R. H. In all experiments the blood flow was controlled during the collection of samples and thus kept at a rate, corresponding to about the normal.

Control samples were taken from a branch of the femoral artery at the beginning of the experiment. Table 3 gives the result of experiments on 6 dogs.

Table 3.

*Histamine content of blood and plasma before and during R. H. in the dog's forelimb.*

Nr	Histamine content in $\gamma$ per liter		Duration of obstruction in min.	Sample
	Normal	Hyperaemia		
1	10	8	20	total blood
2	9	14	15	plasma
3	10	10	20	plasma
4	19	20	20	plasma
5	22	24	30	plasma
6	12	9	30	plasma

As will be seen from table 3, no evidence could be obtained of an increase in the histamine content of blood and plasma during R. H. in the dog's forelimb.

C. *The human arm.* The blood flow was obstructed by inflating a rubber cuff above the elbow. Precautions were taken to secure a complete obstruction. When collecting blood samples during R. H. the pressure in the cuff was reduced to about 90—100 mm Hg, thus allowing a very slow outflow of hyperaemic blood. At the beginning of the experiment control blood was taken from the other arm's cubital vein with the slightest possible interference with the flow.

Table 4.

*Histamine content of plasma before and during R. H. in the human arm.*

Nr	Histamine content in $\gamma$ per liter		Duration of obstruction in min.
	Normal	Hyperaemia	
1	23	17	10
2	19	20	20
3	30	26	20
4	20	17	20

D. *Experiments on a dog with a gastric pouch.* A dog with a gastric pouch of the type described in the previous paper was used for this experiment. In the unfed, not anesthetized dog 7 cc gastric juice was obtained from the pouch when as little as 0.5  $\gamma$  histamine base per mg and minute was injected intravenously during 15 minutes. This rate of injection caused an increase in the histamine concentration of the systemic plasma which was too small to be demonstrated by the BARSOU-M-GADDUM method.

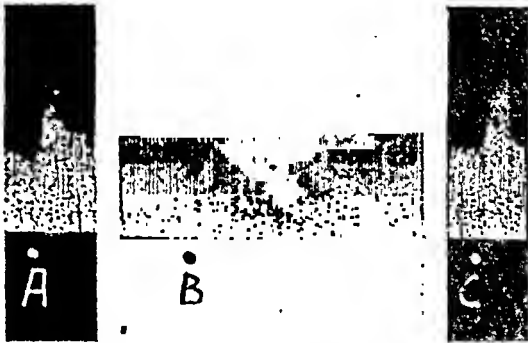


Fig. 1. Guinea-pig, 320 g, under urethane. The bronchiolar tone was registered by the method described in the previous paper. At A 0.54  $\gamma$  histamine was injected intravenously, at B the abdominal aorta was unclamped after having been completely obstructed underneath the renal arteries during 20 minutes and at C 0.2  $\gamma$  histamine was injected. Time in minutes. There is a pause of about ten minutes between each section of the figure.

Before the actual experiment on reactive hyperaemia the rate of the spontaneous secretion from the pouch was observed. In 15 minutes 2 cc of mucous juice were collected from the cannula. The blood flow through all the limbs was now obstructed intermittently during 30 minutes, in the forelimbs by tying rubber tubings around the legs, in the hind limbs by occluding the femoral arteries manually. Every three minutes the blood was released for half a minute. During these 30 minutes and during the following hour there was no increase in gastric secretion from the pouch.

E. *Reactive hyperaemia after obstruction of the abdominal aorta.* In four guinea-pigs under urethane, which all responded with a bronchoconstriction to intravenous injections of 0.3  $\gamma$  histamine, reactive hyperaemia was elicited by occluding the abdominal aorta immediately underneath the renal arteries. Fig. 1 shows such an experiment. The bronchiolar tone was measured by the method described in the previous paper. At A. 0.54  $\gamma$  histamine was injected intravenously, at B. the abdominal aorta was un-

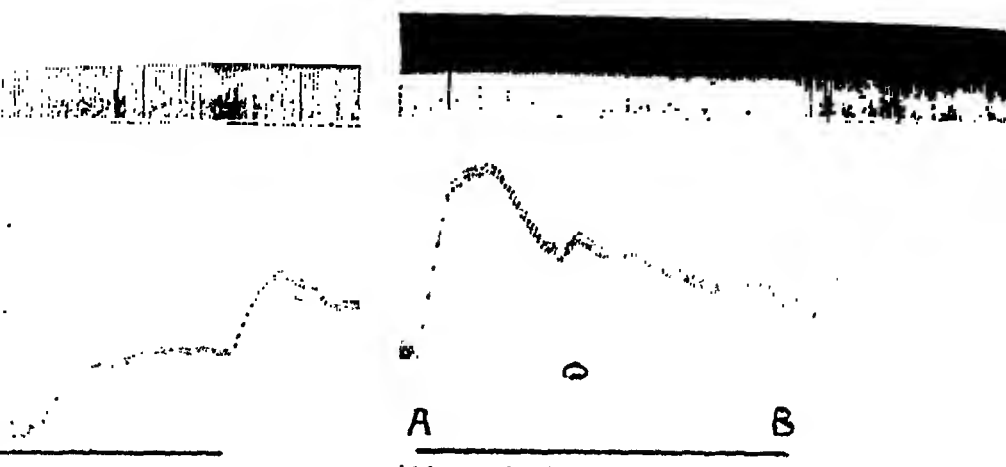


Fig. 2. Cat, 1.5 kg, chloralose 75 mg/kg intravenously. The bronchiolar tone, the blood pressure in the femoral artery and the gastric secretion were measured. In the first section of the tracing 0.7  $\gamma$  histamine per kg body weight and minute was injected intravenously during six minutes. At A the abdominal aorta was completely obstructed underneath the renal arteries. At B the aorta was unclamped.

clamped after having been completely obstructed during 20 minutes. There is no bronchoconstriction following the release of the blood flow, although the bronchi at C. constrict even at 0.2  $\gamma$  histamine.

The same type of experiment was performed on four cats under chloralose. As indicators we used the arterial blood pressure, the bronchiolar tone and the gastric secretion. Fig. 2 represents a typical experiment. The sensitivity of the indicators was first tested by injecting 0.7  $\gamma$  histamine per kg and minute intravenously during six minutes which caused an unusually prolonged fall in blood pressure, a bronchoconstriction and the secretion of 3 cc gastric juice. At A the abdominal aorta was clamped underneath the renal arteries. After 10 minutes the aorta was unclamped at B. The reactive hyperaemia caused no bronchoconstriction, no secretion of gastric juice and no significant fall in blood pressure. In none of our experiments on guinea-pigs and cats there was any indication of histamine being liberated into the blood stream during reactive hyperaemia.

## II. Experiments on Tetanized Muscles.

A. *The dog's gastrocnemius.* In dogs under chloralose the gastrocnemius was prepared by the method devised by ANREP and SAALFELD. This technique enables the control of the arterial inflow to and the venous outflow from the muscle.<sup>1</sup> The sciatic nerve was embedded in a stimulating electrode. The gastrocnemius was tetanized maximally 45 times a minute with A. C. at a frequency of 1000 Herz. The venous outflow from the gastrocnemius was reperfused into the jugular or the femoral vein. The artery to the gastrocnemius was connected with the femoral artery by means of a rubber tubing into which a T-tube was inserted. At the beginning of the experiment heparine was injected and control samples withdrawn from the T-tube. The rate of the blood flow through the rhythmically tetanized gastrocnemius was about three times greater than when the muscle was resting. During the collection of the actual samples, which started a few minutes after the onset of tetanization, the arterial inflow was greatly reduced by adjusting a clamp, fitted at the connecting rubber tubing.

We performed such experiments on 2 dogs. (Table 5).

Table 5.

*Histamine content of arterial and venous blood of rhythmically tetanized gastrocnemic muscles.*

Nr	Histamine in $\gamma$ per liter		Samples
	Arterial	Venous	
1	10	8	total blood
2	12	7	plasma

B. *The dog's tongue.* Arteries and veins of the tongue were exposed and stimulating electrodes placed on the hypoglossa nerve of one side. The vein of the same side was cannulated and the outflowing blood reperfused. Control samples were taken from

<sup>1</sup> One of the authors of this paper (G. K.) studied this method during a visit to Prof. ANREP's laboratory in Cairo and wishes to express his thanks to Prof. ANREP for his kind advice.

a femoral artery and from the lingual vein. The tongue was tetanized in the same way as the gastrocnemius. The blood flow during rhythmic tetanization was about four times greater than during rest. The collecting of blood was started about one minute after the beginning of the stimulation and continued during the period of tetanization. During the collection of blood, the blood flow through the tongue was reduced by clamping the arteries.

The arterial supply to the tongue seems to be strictly unilateral. We injected a dye solution in a lingual artery and found that only the corresponding half of the tongue was coloured. This is the reason why we did not care to stimulate both hypoglossal nerves or collect blood from both veins.

We tetanized the tongues of 4 dogs. The results are given in table 6.

Table 6.

*Histamine content of venous blood and plasma from the tongue before and during tetanization.*

Nr	Histamine in $\gamma$ per liter		Sample
	resting	tetanus	
1	10	10	blood
2	19	20	plasma
3	19	24	plasma
4	9	13	plasma

C. *The human arm.* The blood flow through the arm was obstructed and the muscles of the forearm were tetanized rhythmically and voluntarily. Within a few minutes the skin was strongly bluecoloured and capillary haemorrhages could be observed. At this stage the collection of blood from the cubital vein was started. The pressure in the inflated cuff was lessened so as to allow only a very slow flow of blood through the arm. Although the muscle contractions in the anemic arm gradually became very weak the voluntary impulses were maintained during the whole course of blood collection. In three of the experiments the blood flow was obstructed during 5—15 minutes before the period of voluntary tetanization. Control samples were taken from the other arm. Table 7 gives the result of six experiments.

Table 7.

*Histamine content of venous plasma from the tetanized and ischaemic human forearm.*

Nr	Histamine in $\gamma$ per liter		Duration of obstruction before tetanus	Duration of tetanus in minutes
	Normal	Hyperaemia		
1	20	20	5	5
2	13	9	5	5
3	28	33	15	5
4	60	54	0	5
5	33	43	0	4
6	52	36	0	3

### III. The Histamine Content of Resting and of Tetanized Muscles.

These experiments were performed in order to investigate if tetanization diminishes the histamine content of muscles. The gastrocnemius and soleus muscles of anesthetized dogs were maximally tetanized rhythmically by stimulating the sciatic nerve during an hour. At the end of the tetanus the muscles were excised; the resting gastrocnemius and soleus muscle of the other leg were used as controls. The muscles were minced, a sample was ground in a mortar with quartz powder and trichloroacetic acid, filtered and prepared as described for blood. The histamine content was estimated (Table 8).

Table 8.

*Histamine content of resting and tetanized dogs' muscles.*

Dog Nr	Histamine in $\gamma$ per kg		Muscle
	Resting	Tetanized	
1	950	975	Gastrocnemius
1	1,025	775	Soleus
2	925	850	Gastrocnemius
3	1,375	1,275	Gastrocnemius
3	1,300	1,425	Soleus

The figures of table 8 suggest that the histamine content of the gastrocnemius and soleus muscles is not diminished by tetanization.



### Discussion.

Although the dog's heart supplies an excellent preparation for studies in reactive hyperaemia and muscle metabolism we did not repeat the experiments of ANREP et al. (1936) on the liberation of histamine by the heart muscle. These experiments have already been repeated by C. L. EVANS et al. (1938), who in technically very careful experiments found no evidence for the production of histamine by the dog's heart.

In the experiments on rabbits by BILLINGS and MAEGRAITH (1938) the histamine content of venous blood from the leg started to rise above normal 6 hours after tying the common iliac artery. As no increase in the histamine content occurred at an earlier state of reactive hyperaemia this observation hardly supports the theory of ANREP et al. that histamine is engaged in causing the reactive vasodilation.

ANREP et al. (1939) have confirmed a statement by SCHULTE (1929) that the histamine content of muscles decreases on tetanization. SCHULTE, however, after extracting the muscles with alcohol, omitted to destroy alcohol-soluble substances other than histamine, which would also contract the guinea pig's small intestine used for the assay. And as he also failed to atropinize the gut it is very unlikely that SCHULTE's figures give the real histamine content of the muscles.

In BILLING's and MAEGRAITH's experiments the histamine content of the leg muscles increased after tying the common iliac artery. This finding does not agree with the view of ANREP et al. that the excess blood histamine is released from the muscle.

In our experiments we invariably failed to find an increase in the histamine content of blood emerging from tissues rendered hyperaemic after previous ischaemia and from tetanized muscles. Differences in the histamine concentration of the order found in ANREP's et al. experiments would be easy to demonstrate by the methods employed by us. There must be some fundamental difference in the way, in which ANREP's et al. experiments and our own were carried out. Or there may be fundamental differences in the animal's mode of response. The figures published from the laboratory in Cairo of the histamine content of dogs' gastrocnemius muscles are 3 to 4 times greater than those found in this laboratory expressed in identical terms (base or acid phosphate). This difference, however, can hardly account for the fact that in ANREP's

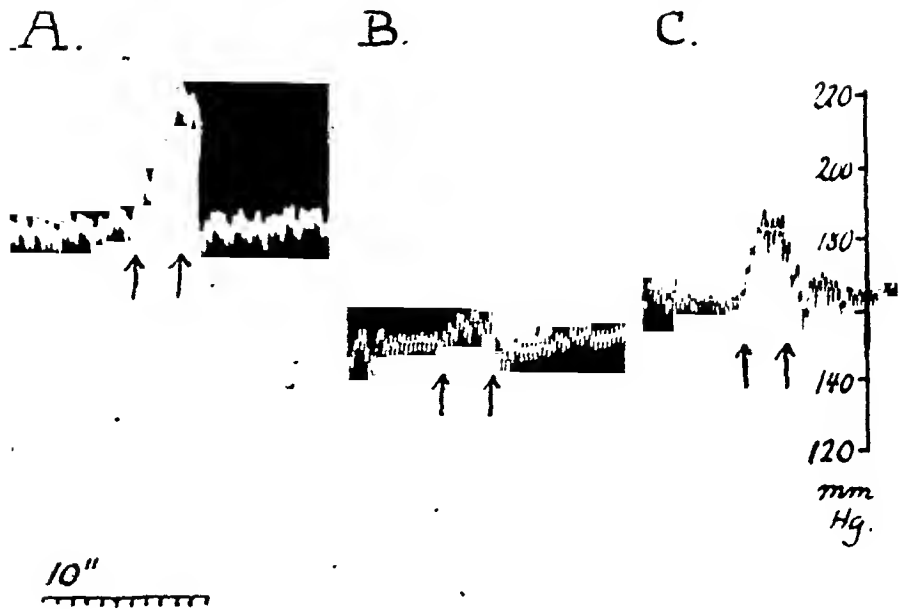


Fig. 2. Cat, chloralose, blood pressure from femoral artery, Common carotids clamped between arrows. A. Normal. B. after local application on sinus of 1 % nicotine acetate. C. about 10 min. later, after removal of nicotine and repeated washings with saline. Time 10 sec.

or in the reaction to lowering or raising the intra-sinusal pressure. If, on the other hand, the lobeline concentration was raised to about 1 : 50,000 the reactions to alterations of the intra-sinusal pressure gradually diminished and finally disappeared. This is illustrated in fig. 1.

Local application of a solution of nicotine acetate 1 % or lobeline hydrochloride 0.3 % on the sinus region by means of cotton wool pads, soaked in the solutions, also caused the normal circulatory reflexes from the sinus to disappear (Fig. 2). This is in agreement with the observations of PI SUÑER and DOMENECH-ALSINA and demonstrates the paralyzing action of high concentrations of these drugs on the baroreceptor mechanism.

## II. Action of Nicotine and Lobeline on the Electroneurogram of the Nerve of Hering.

The electroneurogram is typically influenced by nicotine, as demonstrated by SAMAAAN and STELLA (1935). EULER, LILJE-

et al. experiments on reactive hyperaemia and tetanized muscles the histamine concentration in the plasma increased to about 100 and 1000 per cent respectively, whereas we find no increase whatever.

Our experiments do not exclude the possibility that histamine is liberated and plays a part in reactive hyperaemia and in dilating the small vessels on tetanization. Histamine, even if liberated closely to the smallest vessels, may be resorbed in too small amounts to be detected by the methods employed. In the previous paper we have shown that an increase in the histamine concentration of the plasma which is too small to be detected by the BARSOUM-GADDUM method, may quite well cause a marked vasodilatation. The histaminase, present in the tissues (BEST and MAC HENRY 1930) may participate in preventing liberated histamine — if there is such histamine — from escaping into the blood stream.

FELDBERG and KELLAWAY (1937) injected snake venom in perfused lungs and demonstrated that large amounts of histamine were released into the tissue spaces from where small amounts of fluid leaked out from the lung surface; the histamine concentration in the perfusate was low compared with that of the leakage fluid. The drainage by lymph and blood of normal tissues is of course more efficient than in the lungs rendered oedematous by snake venom, but still, this observation may be of interest for the problem under discussion.

### Summary.

1. During reactive hyperaemia after obstruction of the blood flow to the dog's ear, the dog's forelimb and the human arm, no increase in the histamine concentration of the venous blood emerging from the ischaemic tissues could be demonstrated by the BARSOUM-GADDUM method (applied in CODE's modification).

2. In guinea-pigs and cats, using the bronchiolar tone, the gastric secretion and the arterial blood pressure as indicators, we found no evidence of excess histamine in the blood, when the abdominal aorta was unclamped after having been obstructed during 10—20 minutes underneath the renal arteries.

3. Tetanization of the dog's gastrocnemius, the dog's tongue and the muscles of the human forearm does not cause an increase in the histamine concentration in the venous blood or plasma from these muscles.

## References.

- ANREP, G. V. and G. S. BARSOUM, *J. Physiol.* 1935. *85*. 409.  
—, G. S. BARSOUM and M. TALAAT, *Ibid.* 1936. *86*. 431.  
—, G. S. BARSOUM, M. TALAAT and E. WIENINGER, *Ibid.* 1939. *96*.  
240.  
BARSOUM, G. S. and J. H. GADDUM, *Ibid.* 1935. *85*. 13. Pr.  
— —, *Ibid.* 1935. *85*. 1.  
— and F. H. SMIRK, *Clin. Sci.* 1936. *2*. 353.  
BEST, C. H. and E. W. MAC HENRY, *J. Physiol.* 1930. *70*. 349.  
BILLINGS, F. T. and B. G. MAEGRAITH, *Quart. J. exp. Physiol.* 1938.  
*27*. 249.  
FELDBERG, W. and C. H. KELLAWAY, *J. Physiol.* 1937. *90*. 257.  
LEWIS, TH. and R. GRANT, *Heart* 1925. *12*. 73.  
—, *The blood vessels of the human skin and their responses*, London  
1927.  
SCHULTE, H., *Arbeitsphysiologie* 1929. *2*. 517.
-

From the Department of Physiology, University of Lund.

## Histamine in Plasma and Methods of its Estimation.<sup>1</sup>

By

N. EMMELIN, G. KAHLSON and F. WICKSELL.

---

The tackling of problems involving the estimation of histamine in blood has been promoted by the device of a convenient method by BARSOUX and GADDUM (1935). This method involves the preparation of an extract followed by its biological assay. The preparation of the extracts includes the following procedures: a) The proteins are precipitated with trichloroacetic acid. b) The trichloroacetic acid is removed from the filtrate with ether. c) Hydrochloric acid is added, the extract is boiled and HCl is removed by distillation with alcohol and by drying in vacuo. d) The histamine is extracted from the dry residue with alcohol saturated with NaCl, the alcohol is removed and the residue taken up in water and neutralized. e) The final extract is tested, in comparison with histamine, on a piece of atropinized guinea-pig's small intestine.

CODE (1937) has modified BARSOUX's and GADDUM's original method and developed a simpler method of extraction. CODE found it unnecessary to remove trichloroacetic acid with ether, since most of this acid was destroyed during boiling with concentrated HCl. In CODE's experiments final extraction with water was more satisfactory than extraction with hot absolute alcohol.

CODE (1937), CODE, EVANS and GREGORY (1938) and MAC INTOSH (1938) tested the accuracy of different modes of extrac-

---

<sup>1</sup> Received 24 March 1941.

tion by examining the recovery of small quantities of histamine added to blood. In the experiments of CODE et al. 10—10  $\gamma$  histamine<sup>1</sup> was added to blood of very small histamine equivalents (10  $\gamma$ /l or less) with a recovery of 86—102 p.e. if extracted as in CODE's modification of the original method. MAC INTOSH found like CODE that the chief loss of histamine took place during the stage of extracting with absolute alcohol saturated with NaCl as originally devised. If special care was taken during the extraction with hot alcohol MAC INTOSH satisfactorily recovered 20  $\gamma$ /l histamine added to dog's blood. MAC INTOSH recommends to retain the removal of trichloroacetic acid and with ether, since this facilitates the later removal of HCl and also removes surface-active substances which may interfere with the assay on the gut.

ANREP et al. (1939) added large quantities of histamine (66  $\gamma$ /l) to defibrinated dog's blood and obtained full recovery with the original as well as with the modified mode of extraction. These authors argue however, that CODE's modified procedure cannot be applied to the estimation of histamine in whole blood because of the presence in watery extracts of an alcohol-insoluble agent, which contracts the guinea-pig's gut. ANREP et al. suggest that this substance is in part responsible for the "histamine like activity" of CODE's water extracts. The presence of this agent is according to these authors responsible for the fact that the histamine equivalent of blood is higher when extracted with the modified procedure. As ANREP's et al. alcohol-insoluble, the gut-contracting agent was found to be derived from the erythrocytes, CODE's procedure is stated to be applicable only to serum and plasma.

There is good evidence for the assumption that the active agent assayed in BARSOU-M-GADDUM's and CODE's extracts is identical with histamine. When tested against histamine on the guinea-pig's ileum, the fowl's rectal caecum, and on the cat's blood pressure the extracts are found to contain the same amounts of histamine activity (BARSOU-M and GADDUM, CODE, BARSOU-M and SMIRK). Besides, the activity is destroyed by histaminase. However, the value of the methods of extracting are limited in an essential aspect: They do not show whether the histamine yielded on extraction is present in the blood in a physiologically active state or if it is set free from some physiologically inactive, complex compound during the chemical treatment of the blood.

<sup>1</sup> All figures in this paper are expressed in terms of histamine base.

In the first part of our paper the accuracy of CODE's simplified extraction is examined. In the second part we deal with the problem of detecting physiologically active histamine in the circulating blood. As it is only when present in the plasma that histamine is capable of performing any physiological actions we only deal with the histamine activity of plasma.

### The Accuracy of the Modified Barsoum-Gaddum Method.

We have tried to examine the degree of accuracy with which the histamine activity in the plasma can be preserved through all the necessary chemical manipulations to the final watery extracts and to which extent quantitative differences of activity may be established. In agreement with previous authors we think that the accuracy of the method is best tested by adding known quantities of histamine to plasma and then passing the samples through the routine procedures and testing them pharmacologically against standard solutions of histamine.

Our technique of preparing and testing the extracts is in the essential parts identical with CODE's: Heparinized blood is withdrawn into a centrifuging tube and centrifuged. 5—10 cc of plasma is added to 10—15 cc 10% trichloroacetic acid (when pipetting the plasma we carefully avoid contact with the white cell layer, which CODE (1937 b) found to be very rich in histamine). The mixture is left for 30 minutes and then filtered as described by CODE. 10 cc concentrated HCl is added and the sample boiled during 1½ hour. It is then distilled with absolute alcohol in vacuo. The dried residue is taken up in water and neutralized with NaOH using bromthymol blue as indicator.

The final assay is performed on the guinea-pig's ileum. The Tyrode solution contains atropine sulphate in the concentration 1 : 2 · 10<sup>6</sup>. Since BLASCHKO and SCHLOSSMANN (1938) showed that the small intestine is most sensitive to adrenaline at about 30° C and ZADINA (1939) found that the isolated guinea-pig's ileum is maximally sensitive to histamine at temperatures lower than 37° C we have in many experiments performed the test on the gut at a temperature of about 32° C. We have found this proceeding satisfactory. We are not able to show however that the lower temperature gives a distinct advantage as to the degree and constancy of sensitivity.

In investigating the accuracy of this method histamine was added to the plasma before the precipitation with trichloroacetic acid. Most samples were tested independently by two of us. The data collected are given in table 1. The fourth column ("observed figures", 0) gives the individual figures obtained on

assaying the extracts on the gut. The fifth column represents the "calculated figures" (C). The Standard Deviation ( $\sigma$ ) of the observations is calculated from the formula  $\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(O-C)^2}{n}}$ .

Table 1.

Nr of experiment	Nr of observation	Added Hi γ/l	O	C	O-C	(O-C) <sup>2</sup>			
1	1	0	28	31	- 3	9			
	2	+ 5	35	36	- 1	1			
	3	+ 10	43	41	+ 2	4			
	4	+ 15	47	46	+ 1	1			
2	5	0	38	41	- 3	9			
	6	+ 10	52	51	+ 1	1			
	7	+ 20	60	61	- 1	1			
	8	+ 30	70	71	+ 4	16			
3	9	0	60	54	+ 6	36			
	10	+ 10	65	64	+ 1	1			
	11	+ 20	75	74	+ 1	1			
	12	+ 30	75	84	- 9	81			
4	13	0	70	72	- 2	4			
	14	+ 10	85	82	+ 3	9			
	15	+ 20	85	92	- 7	49			
	16	+ 30	110	102	+ 8	64			
5	17	0	110	110	0	0			
	18	+ 5	110	115	- 5	25			
	19	+ 10	125	120	+ 5	25			
	20	+ 15	125	125	0	0			
A l t e r n a t i v e									
			I	II	I	II	I	II	
6	21	0	115	110	117	+ 5	- 2	25	4
	22	+ 15	105	125	(132)	-20	(-27)	400	—
	23	+ 20	140	130	137	+10	+ 3	100	9
	24	+ 25	145	135	142	+ 5	- 2	25	4
							$\Sigma(O-C)^2=887; 354$		



As is shown in column (O—C)<sup>2</sup> (I) one single figure (nr. 22) will account for nearly half the dispersion. If this figure is included the dispersion will be  $\sqrt{\frac{887}{24}} = \pm 6.1$ . If, however, this figure is excluded the dispersion will not amount to more than  $\sqrt{\frac{354}{23}} = \pm 3.9$ .

The question arises whether it is correct to exclude this figure in nr. 22. Two alternatives are to be considered:

Alternative I.  $\sigma = 6.1$  is correct; then the figure nr. 22 falls 3.3 times outside  $\sigma$ .

The probability that an obtained figure should fall 3.3 times outside  $\sigma$  is  $10^{-3}$ , i. e. in 1,000 observations this would happen once. As only 24 observations have been made for this study, it would thus be unreasonable to let this figure influence our calculations.

Alternative II.  $\sigma = 3.9$  is correct; then the figure nr. 22 falls 5.2 times outside  $\sigma$ . The probability that an observation should fall that far outside the dispersion is  $2 \cdot 10^{-7}$ , i. e. once in 5 000 000 observations. Evidently it would be still more unreasonable not to discard the figure in question. From this reason we consider the calculations by the second alternative as justified.

$$\text{The standard deviation } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (O-C)^2}{n}} = \sqrt{\frac{354}{23}} = \pm 3.9.$$

$$\text{The mean error of the dispersion } \varepsilon(\sigma) = \frac{\sigma}{\sqrt{2 \times n}} = \pm \frac{3.9}{\sqrt{46}} = \pm 0.6.$$

The histamine content of the six samples of plasma averages 71  $\gamma/l$ .

$$\text{Expressed in per cent, } \sigma = \frac{(\pm 3.9 \pm 0.6) \cdot 100}{71} = \pm 5.5 \pm 0.8$$

$$2 \sigma = \pm 11.0 \pm 1.6 \text{ per cent.}$$

If we want to be sure that an obtained figure should be correct with a probability of 95 per cent, which is quite satisfactory for our purpose, the figures obtained by the modified BARSOU-MGADDUM method are impaired with an error of less than 11 per cent.

### The Concentration-Action Curve and its Bearing on the Assay.

Fig. 1 represents the concentration-action curve of histamine on a guinea-pig's ileum. The ordinate represents the degree of the contraction, where 100 per cent corresponds to the maximal contraction, and the abscissa to the histamine concentration.

The assay is naturally most accurate in that part of the curve, where small changes in the concentration produce big changes in the response. This relation is covered by concentrations causing contractions up to about 60 per cent of the maximal response. The first part of the curve up to about 10 per cent of the maximal contraction is less reliable, because the response to the lowest active concentrations is irregular.

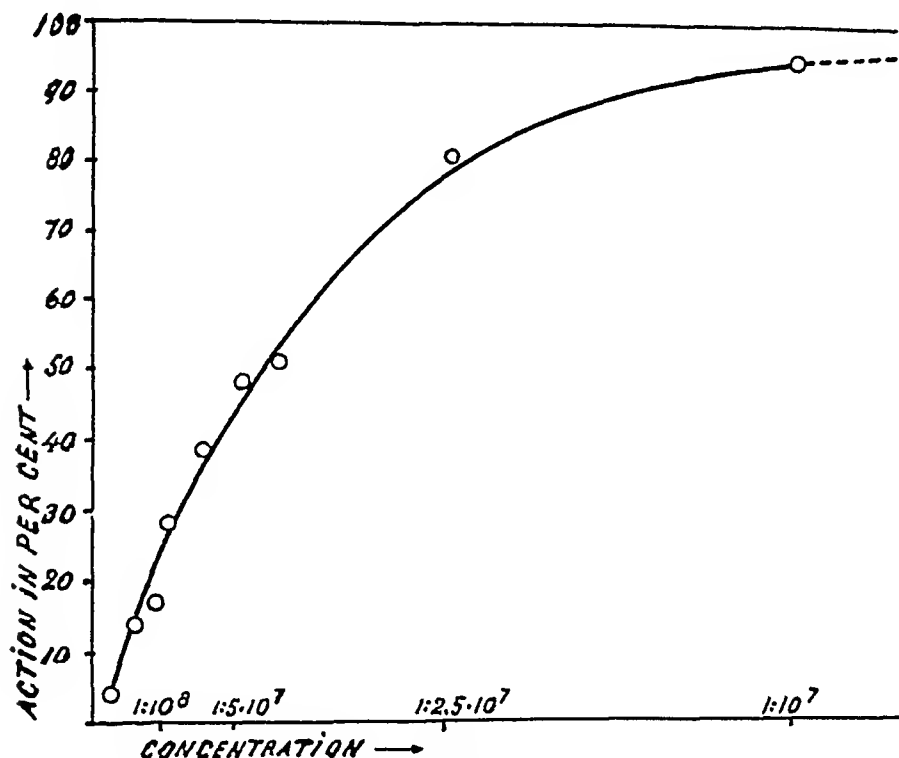


Fig. 1. Concentration-action curve of histamine on a piece of guinea-pig's ileum.

The sensitivity of most specimens of ileum is such that a histamine concentration in the bath of less than  $1:5 \cdot 10^8$  gives no response or only an inconstant one. To a bath of 2 cc not more than 0.5 cc of the extract should be added. This means that, unless the gut is extremely sensitive to histamine, the limit for a safe assay is 20  $\gamma$  histamine per liter plasma. If extracts corresponding to a lower concentration than 20  $\gamma$ /l are to be tested, the sensitivity and the accuracy of the estimation may be improved by adding histamine to the extract in such amounts that the response falls within the higher part of the concentration-action curve.

The procedure of adding histamine to the extract is in our opinion also of value for the identification of the histamine activity of the extract with histamine. If histamine mixed with the active agent of the extract still corresponds to the concentration-action curve of pure histamine this suggests that the active agent of the extract is identical with histamine. In our experiments the concentration-action curve of the histamine activity of the extract was identical with that of histamine.

### **The Extracted Histamine is not Derived from Histidine.**

It has been demonstrated by several authors in experiments *in vitro* and *in vivo* that histidine may be transformed into histamine. (Recently reviewed by M. GUGGENHEIM 1940.) We have investigated if any histamine is yielded by treating histidine according to the chemical procedures described above. To samples of 5 cc of Tyrode's solution histidine hydrochloride was added in amounts from 0.1  $\gamma$  to 10 mg. The samples were treated with trichloroacetic acid, boiled with concentrated HCl, evaporated and finally tested biologically. There was no histamine like activity in the final extracts.

### **Methods for Detecting Physiologically Active Histamine in Plasma of Intact Animals.**

There is good evidence that histamine or some substance physiologically indistinguishable from it can be liberated locally in response to certain stimuli and escape into the general circulation and from there produce effects on structures highly sensitive to histamine. LEWIS (1927) reports that in a patient with urticaria the production of wheals over an extensive area of skin causes a vasodilatation in the skin of distant regions identical with that produced by a subcutaneous injection of histamine. KALK (1929) irritated mechanically the skin of patients showing dermatographism and obtained on brushing the skin during 5—10 minutes an increased secretion of gastric juice. UNGAR et al. (1935), also using the gastric secretion as an indicator of the release of histamine into the general circulation, experimented on dogs and observed an increase of gastric secretion on antidromic stimulation of sensory nerves and on injection of antigen in a sensitized limb.

On intact animals we have compared the histamine sensitivity of the following indicators: the bronchial tone, the arterial blood pressure, the motor activity of the urinary bladder and the gastric

secretion. We have further tried to establish to what extent the histamine concentration of the plasma must increase in order to affect these indicators. Finally we have tried to answer the question: If histamine, as the result of some stimuli escapes into the plasma, which is then the most sensitive method of demonstrating this histamine, the chemical extraction and assay on the gut or the observation of the above mentioned indicators? In our

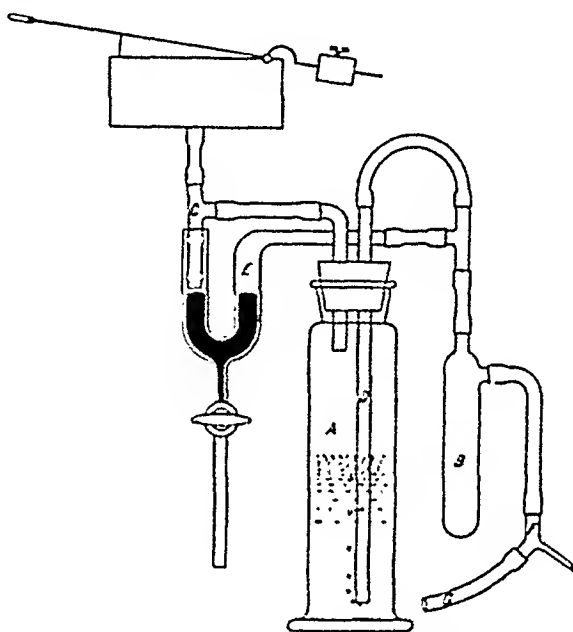


Fig. 2. Arrangement for continual registration of the bronchiolar tone. The cannula F is inserted in the trachea, the tubing G is connected with the Starling respiration pump. At each expulsion of air from the pump air flows into E, elevating the mercury meniscus and thus closing the opening of F. Air then is forced through the bottle A filled with  $H_2O$  or  $H_2SO_4$  into the volume recorder. On bronchoconstriction a greater proportion of the air from the pump enters into the apparatus.

attempts to answer this question we slowly injected histamine intravenously during 5 to 20 minutes at a constant rate until a definite fall in the blood pressure, a bronchoconstriction, an increased secretion of gastric juice or an augmented motor activity of the urinary bladder could be observed. At this moment arterial blood was withdrawn, the plasma extracted and tested for its effect on guinea-pig's ileum. Control samples were withdrawn before the injection. As will be shown later all these indicators proved to be more sensitive to increases in the histamine concentration of the plasma than the method of extracting and assaying the extract pharmacologically.

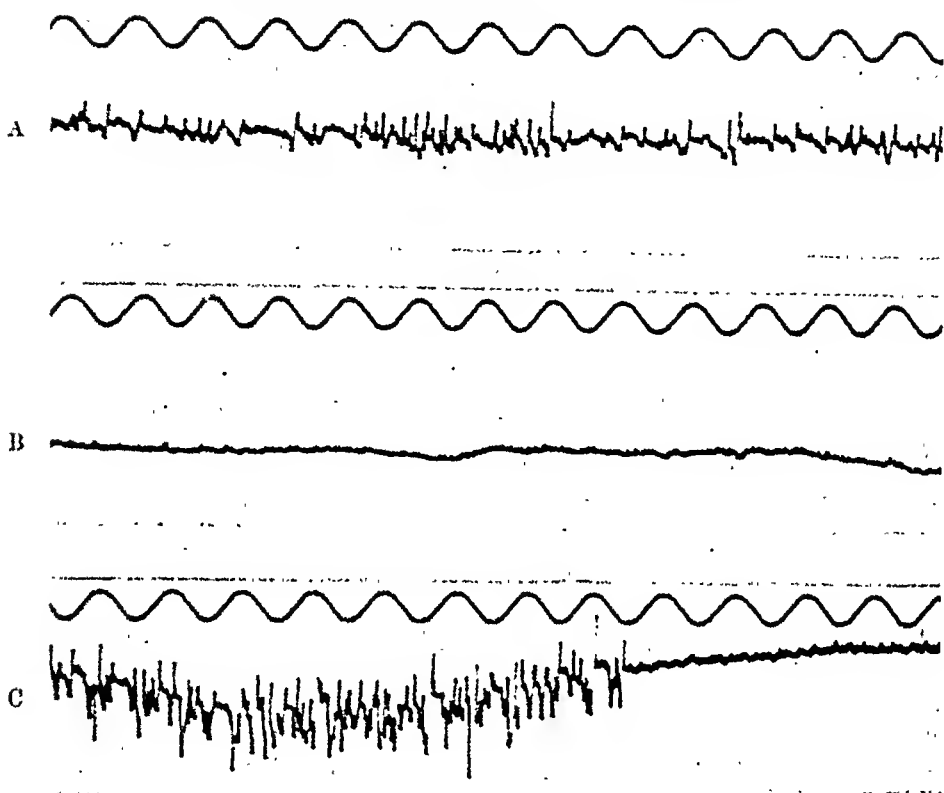


Fig. 3. Cat, chloralose. Action potentials from the sinus nerve. No pulsations in the sinus. A. "chemical" impulses from small fibres. B. impulses suppressed after local application of 0.3 % lobeline hydrochloride on sinus. C. large impulses still appearing on traction of common carotid. Time 1/50 sec. Curves to be read from right to left.

STRAND and ZOTTERMAN (1939 a, b) found that intravenous injections of 1 mg lobeline caused a large increase in the small impulses. Since these drugs, suitably applied, also influence the pressure reflex, we investigated their effects on the electroneurogram of the sinus nerve in the light of these observations.

Local application of nicotine and lobeline in sufficiently high concentrations regularly caused a disappearance of the small, "chemical", impulses, whereas the large impulses were less readily influenced, as shown in fig. 3. As a result of prolonged action, the large spikes too became greatly reduced in number, however, even in cases where the general blood pressure showed no significant changes.

1. *Bronchiolar tone.* Many investigators have observed, like DALE and LAIDLAW (1910), that histamine injected in sufficient quantities causes bronchial constriction. Partly owing to the methods used for registering the bronchoconstriction large doses of histamine were necessary. Recently KONZETT and RÖSSLER (1940) described a method of registering bronchiolar tone, which we found very satisfactory. The arrangement, slightly modified by us, is shown in fig. 2.

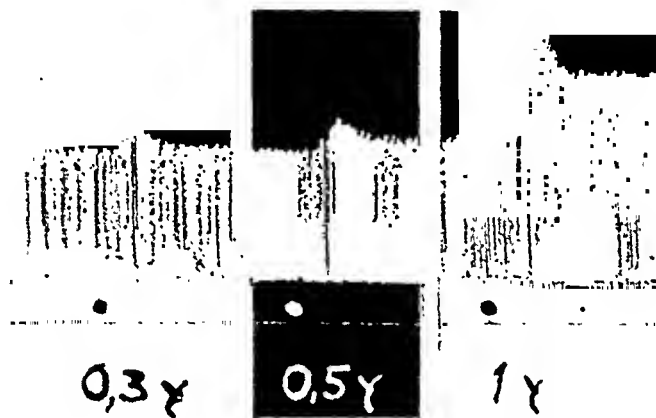


Fig. 3. Registration of bronchiolar tone with the arrangement shown in fig. 2. Guinea-pig 420 gram. 0.3, 0.5 and 1.0  $\gamma$  histamine (base) was injected into the jugular vein with 5 minutes intervals. Time in minutes.

The glassvessel B was attached in order to prevent water from being sucked from the bottle A into the air-entry of the animal, if for some reason the animal performs a violent inspiration. The glass-tube D is movable in the stopper in order to facilitate adjustments during the experiment of the amount of air allowed to pass into the apparatus. The glasstube C is kept centered in the outer glass-tubing E by means of glassnods in order to secure a safe valve-effect of the moving mercury meniscus in E. The Starling respiration pump attached to the tubing G was found very satisfactory. In dogs and cats we use a float recorder (capacity 225 cc), in guinea-pigs a piston recorder (31 mm internal diameter, C. F. Palmer, London). The stroke and rate of the pump should be just sufficient to exclude spontaneous breathing.

In guinea-pigs anesthetized with urethane (1.0 gm per kg of body weight intraperitoneally) 0.5  $\gamma$  histamine injected intravenously will almost regularly cause a bronchoconstriction. Most guinea-pigs up to 400 gram of weight will respond to 0.3  $\gamma$ . Very sensitive specimen respond to 0.2  $\gamma$  and even less. Fig. 3

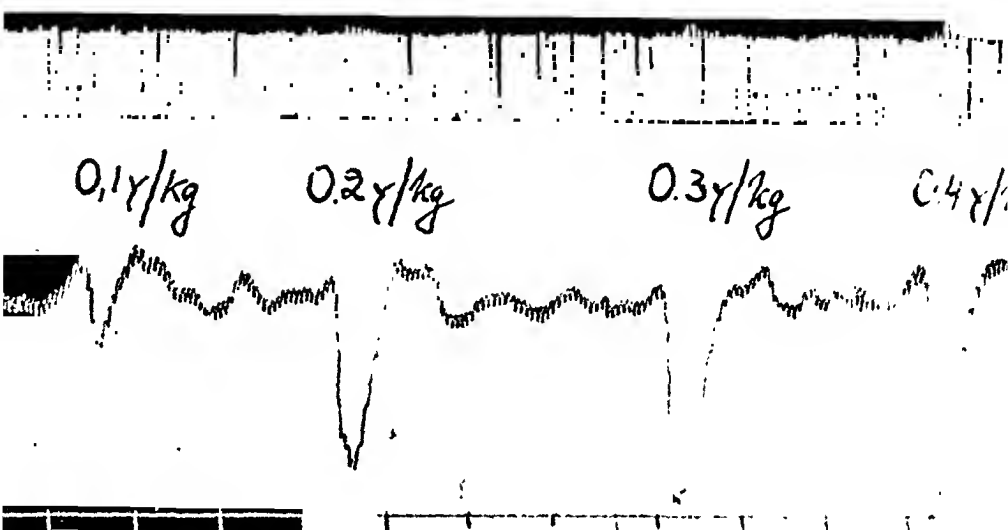


Fig. 4 A. Cat under chloralose. Registration of bronchiolar tone and pressure in the femoral artery. Time in minutes. Rapid injections (5 seconds) of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4  $\gamma$  histamine per kilogram body weight.

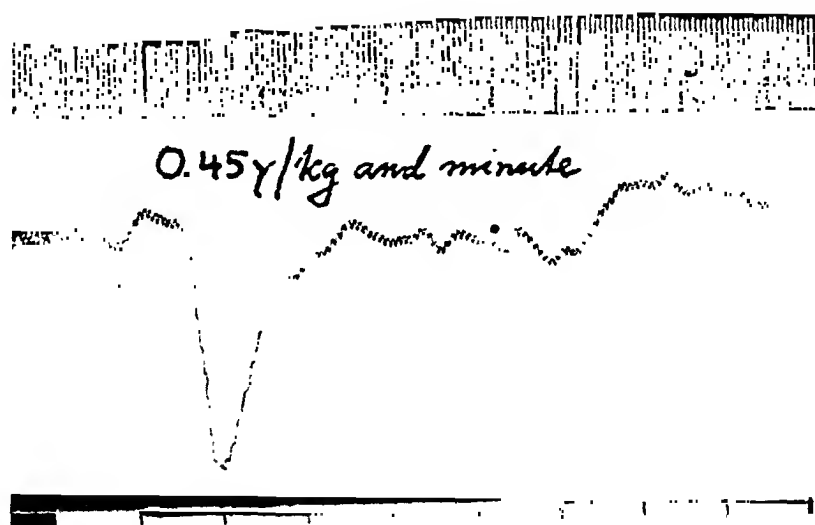


Fig. 4 B. Continued. Slow intravenous injection of 0.45  $\gamma$  histamine per kilogram and minute.

demonstrates the bronchoconstriction in a guinea-pig. If the constriction is strong (1  $\gamma$ ) the smooth muscles relax slowly.

Cat's bronchi in our experiments proved very sensitive to histamine if the animals were decerebrate or lightly anesthetized with chloralose (50—70 mg/kg intravenously). The bronchial constriction is most pronounced if the histamine concentration of plasma is increased during a longer period for example by a slow infusion of histamine. The bronchoconstriction after histamine begins  $\frac{1}{4}$ —2 minutes after the onset of the fall in the blood pressure. This long latency of response may be one of the reasons why the bronchoconstriction is less if the histamine is injected quickly.

In fig. 4 A rapid intravenous injections (5 seconds) of histamine in a cat produce big falls in blood pressure but only a poor bronchoconstriction. In the same cat histamine was then injected slowly at constant rates. Fig. 4 B shows the response to histamine 0.45  $\gamma$ /kg and minute; a marked bronchoconstriction ascends slowly and persists for some time after the end of the slow injection. The bronchi of sensitive cats contract already at a slow injection of 0.35  $\gamma$  histamine per kilogram and minute.

We performed only a few experiments of this kind on dogs. Their bronchi seem to be less sensitive to histamine than those of cats. At least 0.8  $\gamma$ /kg and minute was needed for a demonstrable bronchoconstriction.

We did not investigate if changes in the mucous membrane of bronchi are in part responsible for the narrowing of the air-entry.

2. *The arterial blood pressure.* Cats and dogs, when decerebrate or anesthetized with chloralose, almost regularly showed a fall in blood pressure on a slow injection of 0.3  $\gamma$  histamine per kilogram and minute. In these experiments blood was withdrawn from the femoral artery or from one of its branches during and before injections of histamine. Histamine was injected into the brachial vein and the blood pressure measured in the brachial artery. The results are given in table 2.

As will be seen from this table, the fall in the arterial blood pressure is a very much more sensitive indicator of an increase in the histamine concentration in the systemic blood than is the method of extracting and assaying pharmacologically. This will be still more obvious from table 3.



Table 2.

Nr of dog, body weight and blood pressure at the beginning of slow Hi-injection	Rate of infusion Histamine base $\gamma$ per kg/min	Histamine content $\gamma$ /lit.		Fall in blood pressure mm Hg
		plasma	blood	
Nr I 13 kg 130 mm Hg	0	34	—	0
	0.2	—	—	0
	0.3	—	—	10
	0.8	—	—	25
	1.3	30	—	25
	2.7	35	—	40
Nr II 11 kg 112 mm Hg	5.0	36	—	45
	0	65	90	0
	0.1	—	—	0
	0.3	—	—	5
	0.5	—	—	5
	1.1	—	—	10
Nr III 23 kg 135 mm Hg	2.3	160	95	15
	6.0	180	210	20
	27.0	480	520	100
	0	25	37	0
	0.2	—	—	0
	0.3	22	30	10
Nr IV 17 kg 130 mm Hg	0.7	32	27	20
	1.1	—	—	40
	4.4	69	40	60
	13.0	135	105	70
	22.0	—	—	80
	0	45	—	0
Nr IV 17 kg 130 mm Hg	0.2	36	—	10
	0.4	43	—	20
	0.9	37	—	30
	1.5	44	—	40
	3.8	66	—	45
	7.1	95	—	55

The second column of table 3 gives the smallest amounts of histamine, which on slow intravenous injection caused a definitive fall in blood pressure. The third and fourth columns give the rate

Table 3.

Dog nr	Lowest rate of injection causing a fall in blood pressure	Lowest rate of injection causing a detectable in- crease in the Hi-content of plasma and blood	
	$\gamma$ per kg/min	plasma	blood
I	0.3	5.0	—
II	0.3	2.0	6.0
III	0.3	4.4	13.0
IV	0.2	3.8	—

of injection necessary to cause an increase in the histamine concentration in the plasma and in the blood big enough to be detectable by BARSOUM'S and GADDUM'S original or modified method.

We have frequently observed in cats and dogs that the blood pressure returns to the normal level although the injection of histamine is still continued. Fig. 5 is representative of this type of reaction. Histamine is injected at a constant rate of 1.25  $\gamma$  per kg and minute during 6 minutes. Within 2½ minute after the beginning of the injection the blood pressure has returned to normal and even exceeds this level when the injection is stopped. The bronchoconstriction, however, persists during the full time of increased histamine concentration in the plasma.

In some of our experiments big falls in blood pressure (60 mm Hg and even more) disappeared within a few minutes and the blood pressure returned to normal although the injection of histamine was continued. This behavior cannot be accounted for by the fact that histamine stimulates the suprarenal medulla to secrete adrenaline into the blood stream. (The action of histamine on the adrenaline secretion was recently reviewed by MASAO WADA 1940). We have noticed a similar behaviour of the blood pressure in paranephrectomized cats. The transiency of the fall in blood pressure somewhat vitiates the value of this indicator for demonstrating an increase in the histamine concentration of plasma.

3. *Gastric secretion.* We experimented on cats and dogs. The cats were decerebrated, a catheter being inserted through the mouth into the stomach and histamine slowly injected into a

brachial or femoral vein. The dogs were supplied with a Pavlov pouch, the miniature stomach being separated from the main stomach by a double layer of mucous membrane and draining through a cannula in the abdominal wall. The experiments were performed some weeks after this operation. The skin in the region of the saphenous veins of both hind legs was anesthetized with

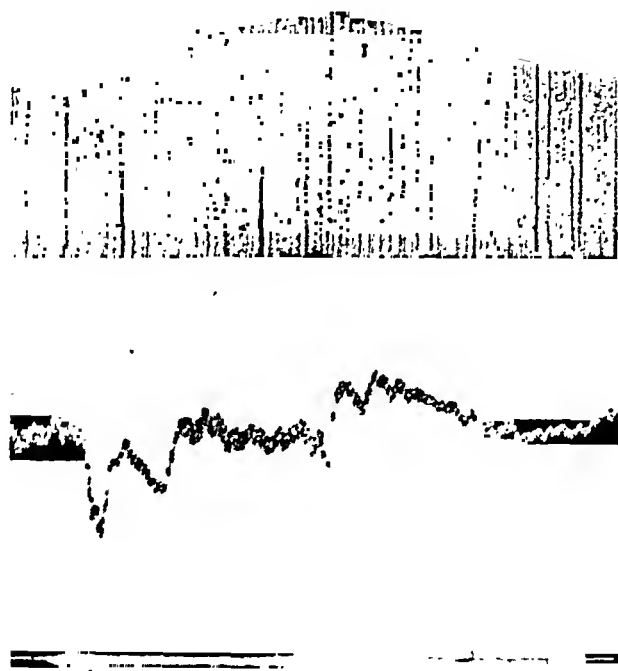


Fig. 5. Cat under chloralose. Bronchiolar tone and pressure in the femoral artery are registered. Time in minutes.  $1.25 \gamma$  histamine per kilogram and minute is injected during 6 minutes.

percaïne. During the experiments the dogs were awake and standing quiet. Histamine was injected slowly into a saphenous vein. Before and during the injection of histamine blood was withdrawn from the other saphenous vein, plasma being extracted and tested for its histamine activity. The results are given in table 4.

In cats the gastric secretion is a less sensitive indicator of an increased histamine concentration in the plasma than the blood pressure and the bronchiolar tone. In dogs the gastric secretion

Table 4.

Animal experimented on	Rate of Hi-injection $\gamma$ /kg and min.	Gastric juice Rate of secretion cc per minute
Dog 21 kg, Pawlov pouch	0.2	0
	0.4	0
	0.5	1.1
Dog 9.5 kg Pawlov pouch	0.4	0
	0.5	0.5
	0.6	0.5
Cat, 2.8 kg, decerebrate	0.7	0.2
Cat, 3.4 kg, decerebrate	0.5	0.1
Cat, 3.7 kg, decerebrate	0.7	0.3
	1.0	1.0
Cat 5 kg, decerebrate	0.8	0.2
	1.5	1.4

is less sensitive than the blood pressure but probably more sensitive than the bronchi. In dogs and in cats, however, the gastric secretion will be stimulated by an increase in the histamine concentration of the plasma, which is too small to be demonstrated by extracting the plasma and testing the extract pharmacologically. We have found like PRATT (1940) that fasting cats under chloralose have no spontaneous gastric secretion.

4. *The urinary bladder.* We have obtained promising but inconsistent results on the cat. We have not as yet been able to find out the experimental conditions under which the bladder always responds to small doses of histamine. This part of our work will be continued.

After operative exposure of the urethra extraperitoneally above the symphysis a cannula was inserted into the bladder through the urethra. The viscus was emptied and 20 to 50 cc warm Tyrode's solution slowly injected into the bladder. The cannula was connected either with a U-shaped manometer filled with bromoform (density: 2,890) or with a membrane manometer for isometric registration. We found cats under chloralose more satisfactory than when decerebrate, since the spontaneous movements of the skeletal muscles in the latter interfere with the registering of the pressure in the bladder.

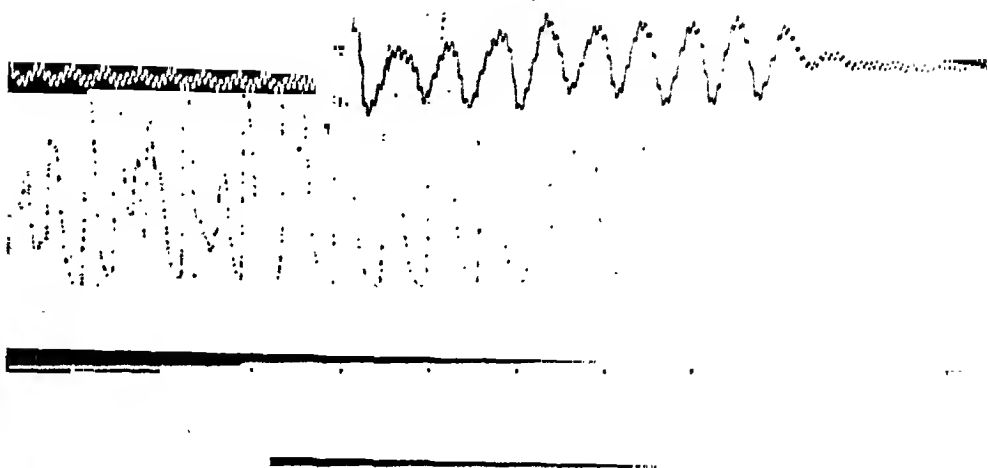


Fig. 6. Cat under chloralose. Pressure in the femoral artery and motor activity of the urinary bladder as registered with a cannula inserted in the bladder and connected with a bromoform manometer. Time in minutes. Injection of 0.66  $\gamma$  histamine per kilogram and minute.

The bladder may respond to histamine either by an increase of the rhythmic contractions already at work before the injection of histamine. Or, if the muscles are at rest, histamine may activate them to contract. As far as we can judge at present this indicator works more satisfactorily if the bladder is filled only to an amount, which will not produce strong motor activity. Fig. 6 and 7 show both types of response.

In a great proportion of the cats examined, the bladder responded to slow injections of 0.6—1.5  $\gamma$  histamine per kg and minute. Injections at these rates cause an increase in the histamine concentration in the plasma too small to be demonstrated by extracting the plasma and testing the extract on the gut.

Among the stimuli and reactions examined by us for their power of liberating physiologically active histamine into the blood stream, there is the venom of *Vipera berus*.<sup>1</sup> In this paper we are

<sup>1</sup> It is shown by FELDBERG and KELLAWAY that snake venom liberates histamine from perfused lungs (*J. Physiol.* 1937, 90, 257).

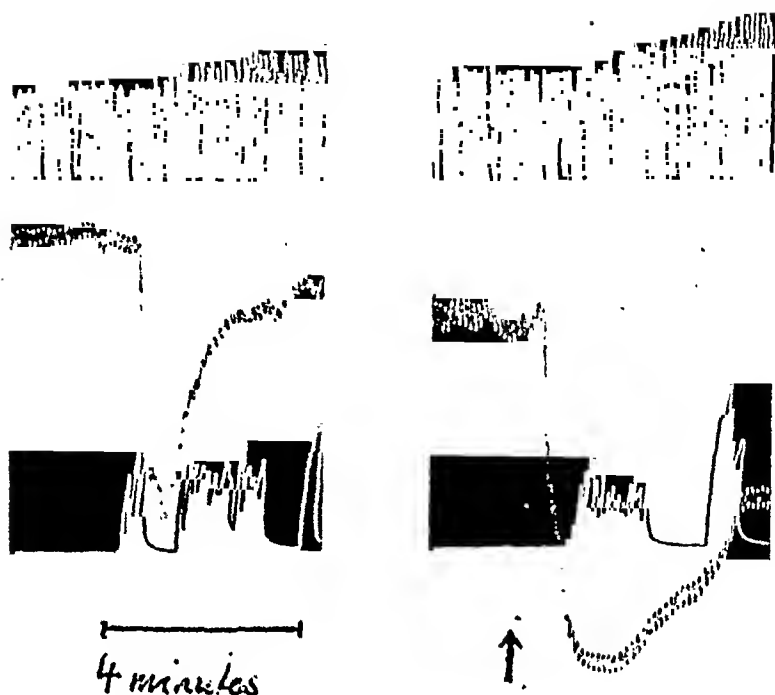


Fig. 7. Cat under chloralose. Bronchiolar tone, pressure in a carotid artery and activity of the urinary bladder are registered isometrically. In the first part of the tracing  $0.8 \gamma$  histamine per kg and minute was injected during 4 minutes. In the second part of the curve  $0.3 \text{ mg}$  dried snake venom was injected intravenously.

not dealing with these experiments. We just want to show in one example how the above described indicators work when physiologically active histamine is liberated into the blood stream. In the experiment represented in fig. 7 the blood pressure, the bronchi and the bladder were first tested for their sensitivity to histamine by slowly injecting  $0.8 \gamma$  histamine per kg and minute during 4 minutes, later  $0.3 \text{ mg}$  dried snake venom<sup>1</sup> was injected intravenously into the cat. The effects on the bronchi, the blood pressure and the bladder are qualitatively identical with those produced by histamine. Quantitatively the effects after  $0.3 \text{ mg}$  venom are stronger than during the previous slow injection of histamine. The effects probably match those produced by approximately  $1.5 \gamma$  histamine per kg and minute. This amount would be too small to cause an increase in the histamine con-

<sup>1</sup> We are indebted to Professor H. PETERSON of the Serum Institute of the previous state of Estonia for generously providing us with pure snake venom.

centration of the plasma big enough to be demonstrable by extracting and testing. The histaminic activity of this cat's arterial plasma was 110  $\gamma$ /l before and 110  $\gamma$ /l after the injection of snake venom. If bigger doses of snake venom are injected intravenously, the histamine concentration of the whole plasma may increase to an amount, demonstrable by BARSOU's and GADDUM's original or modified methods.

### Discussion.

It is striking that, although the plasma contains rather big amounts of "histaminic activity" a small increase in the histamine concentration initiates dramatic changes in vascular and bronchial tone, stimulates the secretion of gastric juice and augments the motor activity of the bladder. The motor and secretory activities remain augmented during the whole period of increased histamine-concentration of the plasma. To produce these dramatic effects the necessary increase in the histamine concentration is so small that it cannot be estimated by BARSOU's and GADDUM's original or modified methods. More concisely expressed, the necessary increase amounts to less than 25 per cent of the normal concentration. The histamine concentration of a cat's plasma, as determined by this method, is for example 100  $\gamma$ /l. At this concentration no gastric juice is secreted, the bronchial muscles are relaxed, the arterial blood pressure is normal and the urinary bladder shows none or only a weak motor activity. On progressively increasing the histamine concentration that stage can safely be defined by the BARSOU-GADDUM method, where the increase amounts to as much as 25 per cent. But long before the histaminic concentration increases from 100 to 125  $\gamma$ /l the studied effectors become strongly activated. Actually, the increase necessary to produce these effects seems to be very much less than 25 per cent. Unfortunately the methods available do not tell the exact figure. However, it seems unintelligible that 100  $\gamma$  histamine per liter plasma should have no effect on the functions studied, whilst a concentration somewhere in between 100 and 125  $\gamma$  per liter should produce big effects. Among other facts, the shape of the concentration-action curves of histamine strongly contradicts this idea. Further, as is shown in table 2 there is no relation in different animals between the "histaminic activity" of the plasma and the amounts of histamine which on injection produce effects.

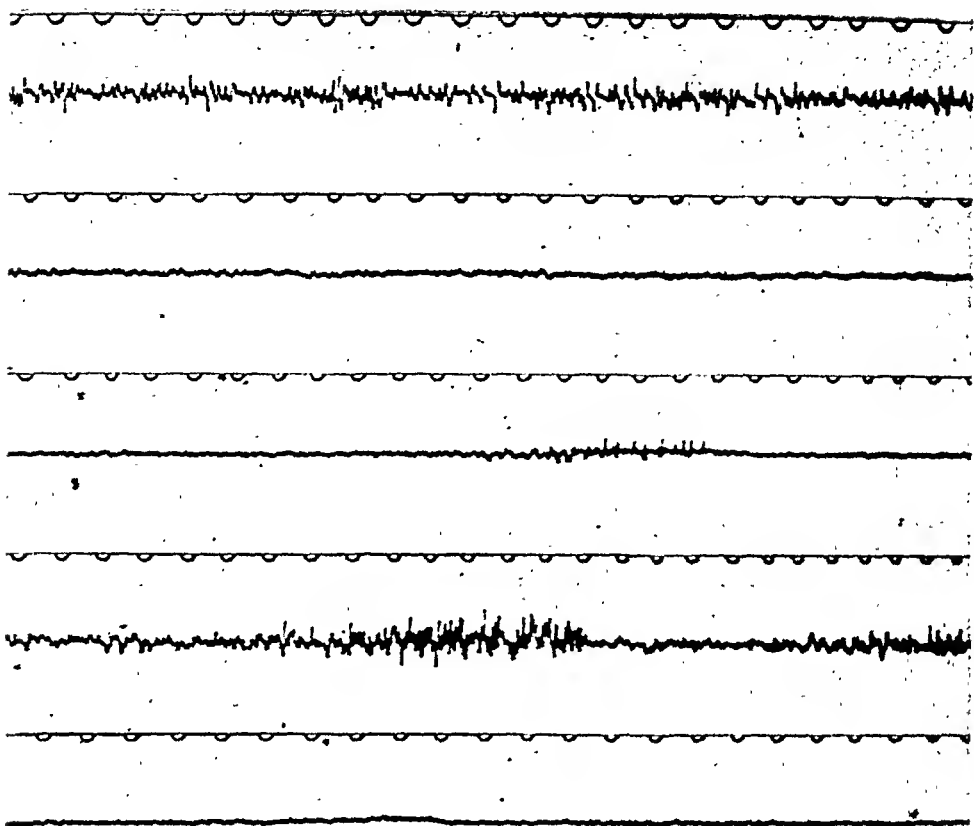


Fig. 4. Cat, chloralose. Action potentials from the sinus nerve. No large impulses. A. spontaneous respiration, air. B. Hyperventilation with oxygen. C. the same after the cutting of both vagodepressors. D. Blood pressure raised by injection of adrenaline. E. after local application of 0.3 % lobeline hydrochloride on sinus. Figures denote arterial blood pressure in mm Hg. Time 1/50 sec. Curves to be read from right to left.

### III. The Presence in the Sinus Nerve of Small Pressure Impulses.

Observations on the electroneurograms and on nerve preparations show that the number of fibres carrying big impulses is often quite small, which is in some contrast to the conspicuous reflex action on the general blood pressure assigned to them. By chance we obtained a sinus nerve preparation which showed no large impulses at all at the systolic increases in intrasinusal pressure. In this preparation spontaneous respiration with air produced the usual picture of small impulses, resulting from oxygen lack and carbon



Such a relation may be expected if the injected histamine adds itself to that normally present when producing effects. Our experiments thus suggest that the histamine extracted and assayed on the gut is present in the plasma in a physiologically inactive state. Histamine, when present in a physiologically active state, will produce effects in much lower concentrations than those indicated by extracting the plasma. Normally there may be no active histamine in the plasma.

THRETHEWIE (1938) has demonstrated that not only the intact cell, but even cellular debris is capable of retaining its histamine. After destruction of the internal structure of the debris this histamine becomes diffusible. THRETHEWIE emphasizes that the presence of cellular debris containing large amounts of histamine must be considered when investigating in tissue extracts the content of "free" and "bound" histamine. According to this author, who investigated the histamine content of the dog's liver, there is no evidence for the presence in this tissue of histamine in a "bound" or "complex" form.

In our experiments the blood cells and cellular debris were spun down by thorough centrifuging. It is further unlikely that the histamine demonstrable in the plasma by the BARSOU-M-GADDUM method has diffused in vitro from the blood cells. If this were so, the histamine activity of the heparinized plasma ought to increase if kept in vitro or centrifuged longer than in the routine procedure. In our experiments there was no evidence of this possibility.

### Summary.

1. The accuracy of determining the histamine concentration in plasma by CODE's modification of the BARSOU-M-GADDUM method is examined and its limitation is evaluated statistically.

2. The concentration-action curve of histamine on the guinea-pig's ileum is studied. The histamine activity of extracts prepared according to the modified BARSOU-M-GADDUM method follows the same concentration-action curve as does pure histamine.

3. The sensitivity as well as the accuracy of the pharmacological assay of extracts containing histamine can be improved by adding small, known quantities of histamine to the extracts.

4. In conditions, where histamine escapes into the systemic blood flow, the procedure of extracting the plasma and assaying the extracts pharmacologically is a much less sensitive test than

the following indicators studied in our experiments: the arterial blood pressure, the bronchiolar tone, the motor activity of the bladder and the secretion of gastric juice.

5. Reasons are given in support of the view that the histamine activity found on extracting the plasma and testing the extract pharmacologically is present normally in the plasma in a physiologically inactive state.

### References.

- ANREP, G., G. S. BARSOUM, M. TALAAT and E. WIENINGER, *J. Physiol.* 1939, *95*, 476.
- BARSOUM, G. S. and J. H. GADDUM, *Ibid.* 1935, *85*, 1.
- BARSOUM, G. S. and F. H. SMIRK, *Clin. Sci.* 1936, *2*, 337.
- BLASCHKO, H. and H. SCHLOSSMANN, *J. Physiol.* 1938, *92*, 26 P.
- CODE, C. F., *Ibid.* 1937 a, *89*, 257.
- , *Ibid.* 1937 b, *90*, 349.
- , C. LOVATT EVANS and R. A. GREGORY, *Ibid.* 1938, *92*, 344.
- DALE, H. H. and P. P. LAIDLAW, *Ibid.* 1910, *41*, 318.
- GUGGENHEIM, M., *Die biogenen Amine*, Basel-New York 1940.
- KALK, H., *Klin. Wschr.* 1929, *8*, 64.
- KONZETT, H. and R. RÖSSLER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1940, *195*, 71.
- LEWIS, TH., *The blood vessels of the human skin and their responses*, London 1927.
- MAC INTOSH, F. C., *Quart. J. exp. Physiol.* 1938, *28*, 87.
- PRATT, C. L. G., *J. Physiol.* 1940, *98*, 1—2 P.
- THRETHEWIE, E. R., *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.* 1938, *16*, 225.
- UNGAR, G. and COWORKERS, C. R. *Soc. Biol. Paris* 1935, *118*, 620; 1935, *118*, 778; 1935, *118*, 1148; 1935, *118*, 1150; 1935, *119*, 702; 1935, *120*, 326; 1935, *120*, 328; *C. R. Acad. Sci., Paris* 1935, *200*, 1790.
- WADA, M., *Tohoku J. exp. Med.* 1940, *37*, 442.
- ZADINA, R., *C. R. Soc. Biol. Paris* 1939, *132*, 28.
-

Aus dem biologischen Institut der Carlsberg Stiftung, Kopenhagen.

## Die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebezellen *in vitro*.<sup>1, 2</sup>

Von

ALBERT FISCHER.

---

Schon seit langem weiss man, dass Tiere sich im N-Gleichgewicht halten können, wenn ihnen Proteinstoffe zugeführt werden, die man vorher zu Aminosäuren abgebaut hatte. Neuere Untersuchungen ergaben, dass junge Tiere nach Zufuhr verhältnismässig geringer Mengen reiner Aminosäuren wachsen und an Gewicht zunehmen können, ROSE (1938). Aus diesen und anderen Feststellungen hat man gefolgert, dass Gewebszellen imstande sind, Aminosäuren direkt zur Synthese der Eiweissstoffe auszunutzen, aus denen das Cytoplasma und seine Produkte bestehen. Im Widerspruch zu diesem Schluss stehen die Ergebnisse der Untersuchungen, die man bisher mit Aminosäuren an gezüchteten Gewebszellen *in vitro* ausführte. Sie waren recht eindeutig und zeigten nämlich, dass Aminosäuren entweder toxisch wirken — und das war der Fall bei zu hoher Konzentration —, oder aber dass sie ohne jeglichen Einfluss auf die Erhaltung des Zellebens oder -wachstums blieben. Diese Divergenz musste natürlich eine gewisse Unsicherheit hervorrufen, und so gab sie sogar mehreren Stellen den Anstoss, die Frage nach einer Resynthese der Eiweissstoffe im Darmkanal selber von neuem aufzuwerfen. Man war sich klar darüber, wie wichtig es sei, das letzte Glied im Kreislauf des Eiweissstoffes im Organismus herbeizuschaffen. Einen Beweis dafür findet man in der Tatsache, dass Untersu-

---

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden u. a. mit Unterstützung der Anna Fuller-Foundation ausgeführt.

<sup>2</sup> Eingegangen am 5. April 1941.

chungen über die Wirkung der Aminosäuren auf gezüchtete Gewebszellen schon ausgeführt wurden, als die Gewebekulturtechnik sich noch in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung befand, und dass sie auch gegenwärtig noch fortgesetzt werden.

BURROWS und NEYMANN (1917) waren die ersten, die sich mit dieser Frage beschäftigten, indem sie die Wirkungen von Mischungen reiner Aminosäuren und abgebauter Proteinstoffe untersuchten. Alsdann folgte eine Reihe Arbeiten von CARREL, BAKER und EBELING (1922, 1924, 1926, 1928, 1933, 1939) MAYER und FISCHER (1937), aus denen hervorging, dass die höheren Abbauprodukte der Eiweissstoffe («Proteosen») wachstumfördernd wirken, auf jeden Fall für kürzere Perioden, und dass die Aminosäuren nicht imstande sind, Zellwucherungen hervorzurufen oder die Lebensdauer der Zellen zu verlängern.

Wir haben nun diese wichtige Frage noch einmal einer Bearbeitung unterzogen und dabei eine neue Technik und ein Verfahren angewandt, auf das man eigenartigerweise früher nicht verfallen war. — Im folgenden sollen die Wirkungen der Aminosäuren und der höheren Spaltungsprodukte der Eiweissstoffe auf gezüchtete Gewebszellen beschrieben werden, wobei sich zeigen wird, dass die Säuren doch direkt von den benutzten Gewebszellen ausgenutzt werden. Diese sind nämlich nicht selber imstande, wie man gemeint hat, die Proteine des Blutplasmas abzubauen. Aus den Arbeiten CARRELS und seiner Mitarbeiter geht hervor, dass sie die Entscheidung der Frage danach einzurichten gedachten, ob die Zellen auf Aminosäuren durch Massenwachstum reagierten oder nicht. Darin aber liegt einzig und allein der Grund, warum die Wirkung der Aminosäuren sich der Aufmerksamkeit der Forscher entziehen konnte. Gewiss liesse es sich sehr gut denken, dass die Gewebszellen noch auf andere Weise als durch Grössenanwachs ihre Ausnutzung der Aminosäuren erkennen liessen, sei es, dass diese eine Energiequelle bildeten oder etwa dass sie direkt als Bausteine für das Zellprotoplasma oder dessen Enzymapparat dienten.

Wenn es nunmehr geglückt ist, die Notwendigkeit und den Wert der Aminosäuren für die Erhaltung des Lebens der Gewebszellen nachzuweisen, so ist das einerseits der Anwendung einer neuen Untersuchungsmethode zu verdanken, andererseits aber auch der Befreiung von jener Vorstellung, wonach die Zellen auf Aminosäuren unbedingt mit Wachstum reagieren müssten.

Da sich Aminosäuren in den zur Züchtung von Gewebszellen

gewöhnlich benutzten Nährböden finden, bestand unsere Aufgabe darin, sie daraus zu entfernen. Sind sie für die Gewebszellen von Bedeutung, so musste nun unbedingt ein Mangelzustand eintreten, der dann durch Zusatz von Aminosäuren zum Medium wieder ausgeglichen werden könnte. Obendrein wäre da vielleicht eine Gelegenheit, die Bedeutung der einzelnen Säuren festzustellen. Verpflanzten wir nun Gewebekulturen in Medien, die dialysiertes Plasma, Serum und Embryonalextrakt enthielten, so fanden wir, dass sie innerhalb sehr kurzer Zeit zugrunde gingen. Das Wachstum wurde jäh unterbrochen und die Zellen wiesen schwere morphologische Veränderungen auf: im Anfang wurde das Protoplasma stark körnig, dann allmählich vollständig von Vacuolen durchsetzt, und zuletzt folgte ein Verschwinden der Zellformen und ihre Auflösung. Ausser den Aminosäuren finden sich natürlich noch andere dialysierbare Stoffe im Blute, und wir haben die Hoffnung, durch unser Verfahren auch deren Bedeutung nachweisen zu können.

### Technik.

Die zu den Untersuchungen benutzten Gewebszellen von Hühnern waren in homologen Medien gezüchtet. Blutplasma und Serum werden in der üblichen Weise unter aseptischen Kautelen gewonnen, FISCHER (1930). Um bei der nachfolgenden Dialyse eine Koagulation des Plasmas zu verhindern, werden 25 ml Plasma mit 3 ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem Heparin, 0.5 pro mille, (Aktivität  $K = 1.4$ ; ASTRUP, 1938) versetzt. Benutzt man stärkere Heparinpräparate, so wird man die Menge natürlich entsprechend verringern. Die Dialyse von 25 ml Blutplasma führt man aus gegen 1.5 l Ringerlösung, die 0.1 % Glukose enthält. In einem 2 l fassenden Erlenmeyer-Kolben hält man 1.5 l der Glukose-Ringerlösung bereit. Um ein Glasrohr bindet man ein Stück Zellophanschlauch, den man unten mit einem Glasstab verschliesst. Zwei Glasarme am oberen Ende des Glasrohres ruhen auf dem Kolbenhals und verhindern so ein Heruntergleiten des Rohres. Oben wird das Glasrohr mit einem Wattepropf verschlossen. Dann kommen Glasrohr mit Zellophanbehälter in den Kolben, und dieser wird oben mit Watte um das Rohr herum verschlossen. Über den Kolbenhals setzt man nun ein Becherglas (Abb. 1) und nun kommt der Apparat mit der Aussenflüssigkeit in den Autoklaven. Nach vollständiger Abkühlung bringt man 25 ml Serum- oder Heparinplasma in den Zellophanbehälter. Der Kolben wird wieder mit dem sterilen Becherglas geschlossen und dann in den Kühlschrank bei  $+2^{\circ} \text{C}$  gebracht. Nach Verlauf von 7—8 Tagen wird das Serum entnommen. Das geschieht in der Weise, dass man mit einer sterilen Pinzette das Glasrohr und den grossen Wattepropf so weit heraushebt, dass die Finger es ergreifen können, ohne den Rand des Kolbenhalses zu berühren.

Der Zellophanbehälter wird abgenommen und über eine grosse sterile Petrischale gehalten. Mit steriler Schere schneidet man ein Loch in den unteren Teil des Behälters, fängt den Inhalt in der Schale auf und kann ihn von da entnehmen.

Die Dialyse des Embryonsaftes wird in gleicher Weise ausgeführt. Man wechselt die Aussenflüssigkeit nicht. Das Verhältnis zwischen dem Inhalt des Zellophanbehälters (25 ml) und 1.5 l wird, wenn das Gleich-

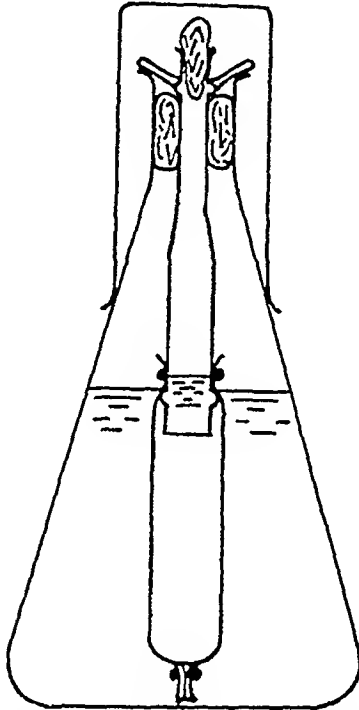


Abb. 1. Einrichtung zur aseptischen Dialyse. Erklärung im Text.

gewicht erreicht ist, einer 60fachen Verdünnung der dialysierbaren Stoffe im Serum entsprechen.

Die Untersuchungen wurden ausgeführt mit periostalen Fibroblasten aus dem *Os frontale* eines 14 Tage alten Hühnerembryos, (DOLSCHANSKY, 1929) nach einer Züchtung durch 7—25 Übertragungen. Jede Kultur wird halbiert, die eine Hälfte dient als Kontrolle für die andere. Für die Versuche wurden Carrel-Flaschen, Type D-3.5, benutzt. Im Verlauf der Arbeiten wurden einige Abänderungen des Verfahrens getroffen. So kam die Methode des wechselnden Auswaschens mit der betreffenden Nährlösung, wie von FISCHER und PARKER (1929) angegeben, zur Anwendung. Die Zellen wachsen im blossen Plasmakoagulum, also nicht unter einer Flüssigkeitsschicht, abgesehen von den vier Stunden jeden zweiten Tag, wo nach einstündigem Waschen mit Tyrode-Lösung die Nährlösung zugesetzt wird. Das pH der Tyrode-Lösung wird auf etwa 7.5 eingestellt, indem man sie vorher mit CO<sub>2</sub> durchperlt.

Ein anderes Verfahren bestand darin, dass man das Wachstum unter einer bleibenden Schicht von 0.5 ml der betreffenden Nährlösung oder von dialysiertem Serum oder Heparinplasma vor sich gehen lässt, denen die Stoffe zugesetzt sind, deren Ergänzungswirkung untersucht werden soll. Setzt man ein klein wenig mehr Heparin dem Plasma hinzu, so kann dieses sich sogar beim Vorhandensein der thromboplastischen Gewebsextrakte bei Körpertemperatur dauernd flüssig halten.

Diese Versuche wurden folgendermassen ausgeführt: 0.5 ml frisches, *nicht dialysiertes* Plasma wird in die Flaschen gebracht. Man setzt 1 ml Ringerlösung und einen Tropfen stark verdünnten, *nicht dialysierten* Embryonalsaft hinzu (4. Zentrifugat). Unmittelbar darauf kommt jede der beiden korrespondierenden Hälften in eine Flasche. Ist das Plasma koaguliert, so setzt man 2 ml Tyrodelösung hinzu, die man nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wieder absaugt. Nun zeichnet man die Umrissc der Kulturen auf und bringt diese dann für 48 Stunden bei 39° C in den Thermostaten. Nach dieser Wachstumsfrist beginnt der eigentliche Versuch. Man wäscht die Flaschen eine Stunde lang mit 2 ml Tyrode und saugt sie wieder ab. In alle Flaschen kommt darauf 0.5 ml dialysiertes Heparinplasma oder Serum mit einem Gehalt von 25 % Tyrodelösung. Die Flaschen mit den Versuchskulturen bekommen ausserdem die Lösung, deren Wirkung untersucht werden soll. Als Ausgleich für diesen Zusatz bei den Versuchskulturen wird den Kontrollkulturen noch das Lösungsmittel (Tyrode oder Ringer) des Stoffes hinzugegeben. Die flüssige Phase in den Kulturen übersteigt selten 0.7 ml. Täglich zeichnet man nun den Umriss der Kulturen auf, untersucht die Zellen sorgfältig im Mikroskop und trägt eine Beschreibung bei der betreffenden Umrisszeichnung ein. Es werden gleichzeitig Versuchsserien in 24—48 Flaschen angelegt, wobei jede Versuchsanordnung drei Kulturen mit den entsprechenden Kontrollen umfasst.

Bei der jeden zweiten Tag ausgeführten Auswaschung mit Tyrode wird schnell ein sehr grosser Teil des Serums, SHIBATA (1929), und namentlich alle dialysierbaren Stoffe aus dem Koagulum entfernt, das in diesem Falle aus *nicht-dialysiertem* Plasma bestand. Bei Zusatz von dialysiertem Serum mit einem Gehalt an Lösungen bekannter Zusammensetzung werden diese im Koagulum schnell aufgenommen und ersetzen die ausgewaschenen Stoffe.

Ein anderes Verfahren beruht darauf, dass die Kulturen von Anfang an in dialysierte Medien eingeführt werden. Dialysiertes Heparinplasma kann, wenn es nicht zu alt ist, leicht mit dialysiertem Embryonalextrakt zur Gerinnung gebracht werden. Bei dieser Methode beginnt der Versuch sofort, also ehe im implantierten Gewebstück Wachstum zustande gekommen ist. Jede der Methoden hat ihre Vorteile, man wird sie je nach den vorliegenden Umständen wählen.



Abb. 2. Photographie der ungefärbten Kultur Nr. 1486 ( $\times 300$ ) in frischem Serum.

## Experimentelles.

### 1.

Halbiert man eine Kultur und bringt jede der Hälften in eine Flasche für sich und in ein Züchtungsmedium, das in beiden Fällen genau das Gleiche ist, so wachsen beide mit derselben, im übrigen recht grossen Schnelligkeit, selbst wenn das Medium vorher mit Tyrode ausgewaschen wurde. Nun wäscht man die Kulturen 48 Stunden später wiederum eine Stunde mit Tyrode. Versetzt man dann die eine Kultur mit 0.5 ml dialysiertem Serum, die andere dagegen mit 0.5 ml desselben, aber nicht dialysierten Serums, so sehen wir folgendes: Während das Wachsen der Kultur im nicht dialysierten Serum mit grosser Intensität weitergeht, gerät es in der Kultur mit dem Dialyseserum fast augenblicklich zum Stillstand. Gleichzeitig machen die Zellen im Dialyseserum





Abb. 3. Photographie d. ungefärbten Kultur Nr. 1891 ( $\times 300$ ) in Dialyseserum.

Veränderungen durch, die sie in starken Kontrast zu denen im normalen Serum bringen. Diese Veränderungen werden von Tag zu Tag grösser. Die Zellgrenzen verwischen sich, die Zellen selber verlieren ihre geometrische Form und fließen in einander über. Das Protoplasma zerfällt zu einer körnigen, unbestimmbaren Masse. Dieser autolytische Vorgang verläuft ausserordentlich schnell und ist ganz augenfällig. Unter gewissen, später noch zu erörternden Umständen verläuft das alles so gewaltig schnell, dass die Zellenkolonie 24 Stunden nach dem Zusatz des Dialyseserums sich in völliger Auflösung befindet und den Eindruck einer direkten toxischen Einwirkung hervorrufen kann (Abb. 2 u. 3). Der Vorgang stellt eine stürmisch verlaufende Reaktion mit ausgeprägten Symptomen eines Mangelzustandes dar, die höchst eindrucksvoll die Bedeutung der bei der Dialyse entfernten Stoffe niedrigmolekularer Art vor Augen führt. Mit diesem Grundversuch haben wir die idealsten Voraussetzungen gewonnen zur Ausfindigmachung von Stoffen, die diesen Mangelzustand auf-

heben können. Wir ziehen daraus die wertvolle Lehre, dass die benutzten mesenchymalen Gewebszellen unter den Versuchsbedingungen *keineswegs imstande sind, die vorhandenen Protein-stoffe direkt auszunutzen.*

Legt man die Kulturen nicht, wie hier beschrieben, in normalem Plasma an, sondern in dialysiertem Heparinplasma, das mit dialysiertem Embryonalextrakt koaguliert ist, so unterbleibt praktisch genommen jedes Wachstum. Höchstens einige wenige Zellen sprossen aus dem implantierten Gewebe heraus und bieten dann alle Anzeichen degenerativer Veränderungen. Aus bestimmten praktischen Gründen, ausserdem auch in Hinblick auf weitere Orientierung, haben wir einen grossen Teil Untersuchungen mit der zuerst genannten Technik ausgeführt, wobei also die Kulturen zunächst kurze Zeit wachsen dürfen, ehe sie den Versuchsbedingungen unterworfen werden. Das verschafft gewisse Vorteile. Zunächst ist es eine Art Sicherung, wenn man beobachten kann, dass die Wachstumsvorgänge vor Beginn der Versuche in Kontroll- und Versuchskulturen genau übereinstimmen. Ausserdem ist es auch wertvoll, die morphologischen Veränderungen, denen die schon ausgewachsenen Zellen unterliegen, beobachten zu können; das ist ja nicht möglich, solange noch kein Wachstum stattgefunden hat.

## 2.

Zunächst war die Frage zu entscheiden, ob die beobachteten Veränderungen der Zellen im Dialyseserum einem Mangel an lebenswichtigen Stoffen zuzuschreiben waren, oder ob sie durch eine bei der Dialyse entstandene irreversible Veränderung der nicht dialysierbaren Komponenten, mit etwaiger toxischer Wirkung im Gefolge, veranlasst wurden. Das wurde auf zweierlei Weise untersucht. Zuerst wurden die Wirkungen des Dialyseserums mit denen der Tyrode-Lösung allein verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Aufhören des Wachsens und das Eintreten der Degenerationserscheinungen schneller in den Kulturen mit Tyrode erfolgt als in den Parallelkulturen mit Dialyseserum. Die Ursache hierfür, die später noch zu besprechen sein wird, muss im DONNANeffekt gesucht werden. Eine andere Versuchsanordnung wurde so getroffen, dass beide Kulturhälften die gleiche Menge Dialyseserum bekamen, aber die eine ausserdem Normalserum, dessen Menge variierte (1951—1974). Während die Kontrollen einen Zusatz von 0.5 ml Dialyseserum, mit gleichen Teilen

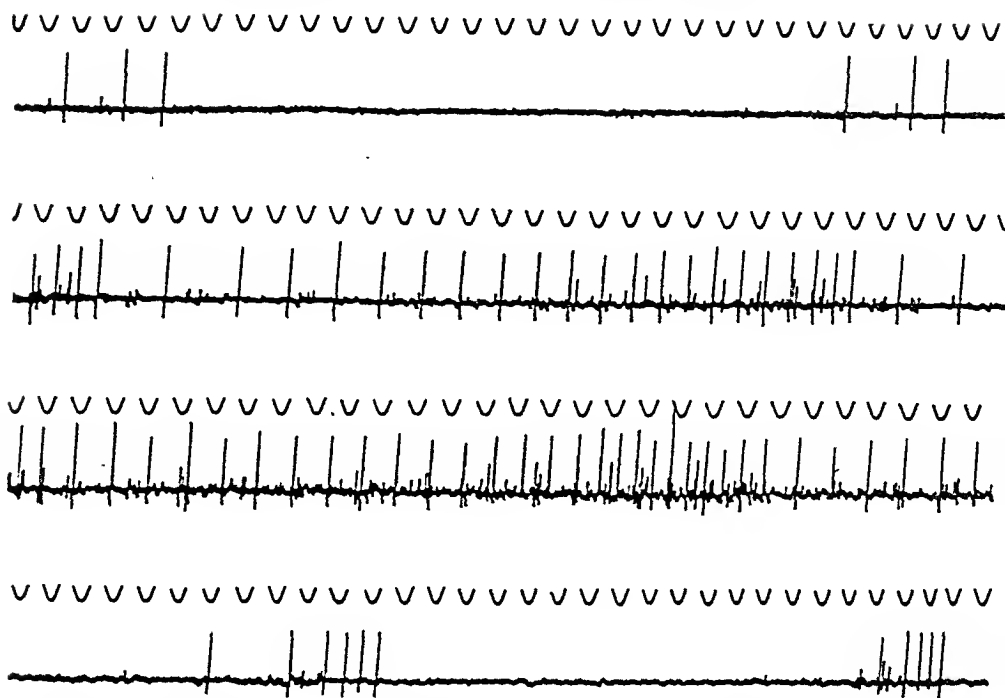


Fig. 5. Sinus nerve, cat. No "chemical" impulses. A. Blood pressure 70 mm Hg, B. 165 mm Hg, C. 220 mm Hg, D. after 3 mg lobeline hydrochloride intravenously. Blood pressure 100 mm Hg. No activation of pressure impulses. Time 1/50 sec. Curves to be read from right to left.

dioxide. These impulses were removed by artificial hyperventilation with oxygen. If, now, the arterial blood pressure was raised from 66 to 114 mm by section of both vagodepressors, a series of impulses appeared at each systole, though the intersystolic phase was free from impulses. Further increase of pressure up to 150 mm Hg, as a result of an injection of adrenaline, greatly augmented these impulses, as is seen in fig. 4 D. We must therefore regard these small impulses as being derived from pressor receptors. Application of lobeline locally removed these impulses, though the general blood pressure remained high (140 mm). In all probability these small pressure impulses play their part in the reflex lowering of the general blood pressure. A closer study of previously obtained electroneurograms of sinus nerve show beyond doubt that, after the removal of the small impulses in the intersystolic phases by injection of ammonia or hyperventilation with oxygen, there is still a considerable number of small impulses during each systole, mingled with the large impulses which usually dominate the picture (see fig. 9 B in EULER, LILJESTRAND and ZOTTERMAN, 1939).

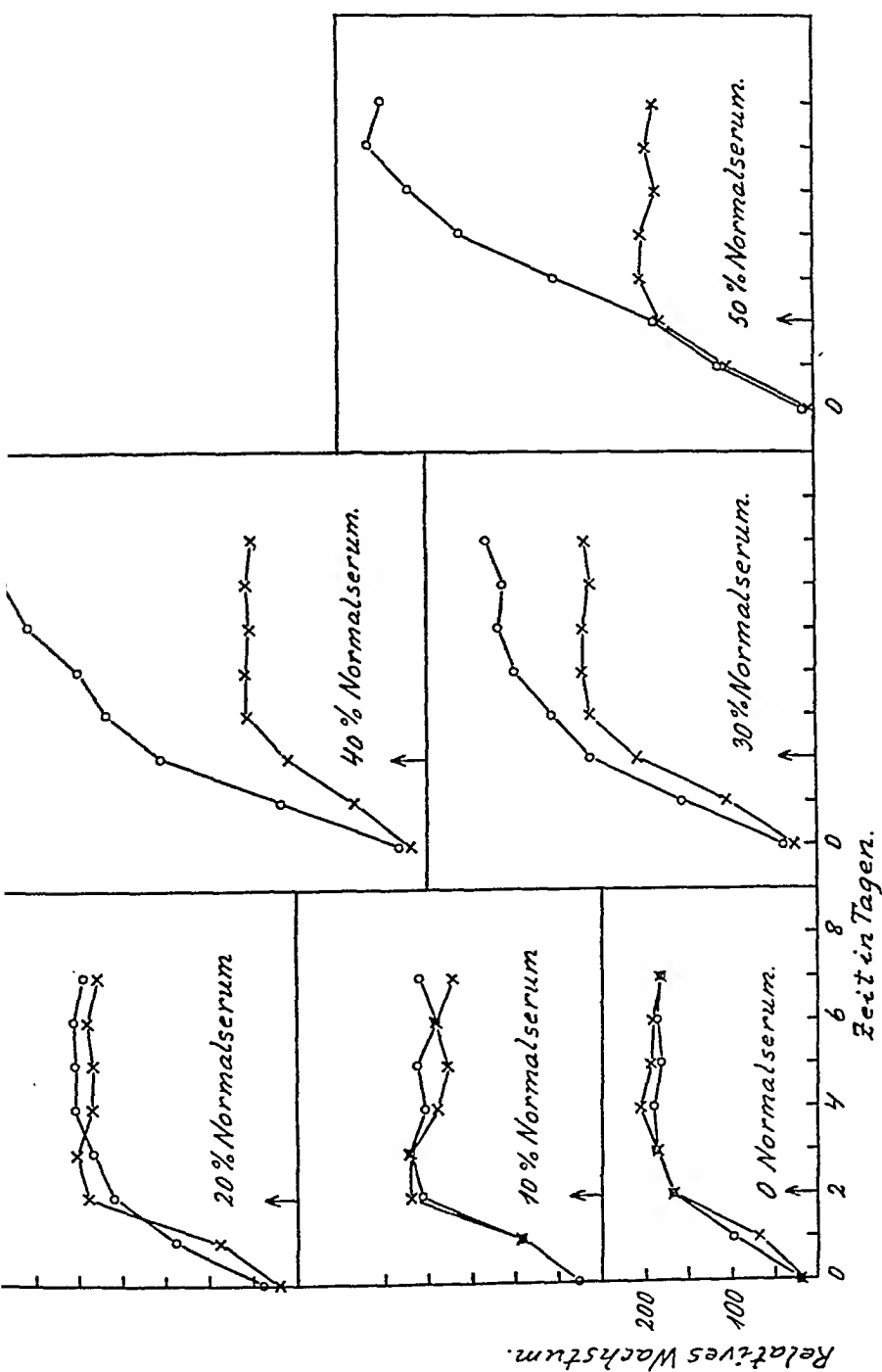


Abb. 4. x = Kontrollen mit Dialyserum; o = Versuchskulturen mit Normalserum. Der Pfeil gibt d. Beginn des Versuchs an. Ordinate = relatives Wachstum in 20facher linearer Vergrößerung. Abscisse = Zeit in Tagen.

Tyrode verdünnt, bekamen, gab man den Versuchskulturen noch 0.5 ml einer der vorher zubereiteten Mischungen folgender Zusammensetzung (Tab. 1).

Tab. 1.

% Tyrode	% Dialyseserum	% Normalserum
50	50	0
40	50	10
30	50	20
20	50	30
10	50	40
0	50	50

Ohne Normalserum befanden sich beide Kulturhälften drei Tage nach Beginn des Versuchs in Auflösung. Bei 10 % *Normalserum* war das Bild ziemlich das gleiche. Bei 20 % *Normalserum* gab es einen deutlichen Unterschied: die Kulturen mit Normalserum (20 %) hatten recht klare und guterhaltene Zellen, bis der Versuch 6 Tage später abgebrochen wurde; die Kontrolle dagegen war nach drei Tagen in Auflösung. In den Gruppen mit 30—50 % Normalserum hielten die Zellen sich bis zum Abbruch der Versuche vollständig klar, während die Kontrollen sich am dritten Tage in Auflösung befanden.

Das beweist deutlich, dass eine verhältnismässig geringe Menge Normalserum imstande ist, die Mängel des Dialyseserums auszugleichen. Während geringe Mengen Normalserum die Degeneration und Auflösung der Zellen verhindern, rufen grosse Mengen sogar Wachstum hervor. Aus Abb. 4 ist ersichtlich, dass das Wachsen fast aller Kontrollen am zweiten Tage nach Anlegung der Kulturen aufhört, d. h. also zu der Zeit, da der Versuch beginnen sollte. Bei den Versuchskulturen trifft das auch bei 0 und 10 % sowie z. T. bei 20 % Normalserum zu. Bei 30, 40 und 50 % Normalserum zeigt sich deutliche Wachstumssteigerung. Bei 20 % sieht man eine erste Andeutung des Wachsens und erkennt auch deutlich die konservierende Wirkung auf die Zellen im Gegensatz zu denen der Kontrollen.

## 3.

Es liegt nahe, die ergänzenden Stoffe im Dialysat zu suchen. Zu diesem Zwecke wurde eine grosse Menge Serum von Ochsen und Hühnern dialysiert. Als Aussenflüssigkeit wurde destilliertes Wasser genommen, um eine zu grosse Salzkonzentration zu ver-

meiden, wenn bei der Abdestillation in Vakuum die Eindampfung erfolgt. Wie erwartet hatte das Dialysat deutlich erkennbare Ergänzungswirkung auf das dialysierte Serum. Aus vorläufig noch unbekanntem Gründen war es jedoch nicht so wirksam wie das intakte normale Serum. Das Dialysat verträgt Kochen und Eindampfung bis zur Trockenheit, ohne seine Wirkung zu verlieren. Eine Lösung der ausgeglühten Salze war inaktiv.

Ganz der Erwartung entsprechend hatte das Ultrafiltrat (Bechold-Filter) von Hühnerserum, verdünnt mit gleichen Teilen Ringerlösung, gute komplettierende Wirkung, allerdings bedeutend geringer als die des frischen intakten Serums.

Unter Hinblick auf eine etwaige Bedeutung dialysierbarer Aktivatorstoffe für enzymatische Vorgänge wurden auch orientierende Versuche mit Dialysaten aus Ochsenhierenextrakt angestellt. Sie erweisen sich unter den Versuchsbedingungen als wirkungslos. Das Gleiche trifft für die Vitamine der B-Gruppe zu. Lebedew-Hefesaft, der im Asbestfilter einer sterilen Filtrierung unterzogen war, besaß einige Wirkung. Es stellte sich heraus, daß diese der Anwesenheit proteolytischer Enzyme im Extrakt zuzuschreiben waren. Nach dem Kochen blieb die Wirkung aus.

#### 4.

Um Klarheit über den Wert höherer und niederer Abbauprodukte der Eiweißstoffe als ergänzende Faktoren des dialysierten Züchtungsmediums zu gewinnen, gingen wir zunächst daran, das bei der Dialyse inaktivierte Serum mit Trypsin abzubauen.

1981—2. 30 ml Hühnerserum, das 8 Tage gegen Ringerglukose dialysiert war, wurde mit 350 ml destillierten Wassers versetzt und mit 15 ml Chloroform geschüttelt, dann mit NaOH bis zur Reaktion auf Phenolphthalein alkalisch gemacht. Nach Zusatz von 0.6 g Trypsin (Merck) wurde es in den Thermostaten bei 39° C gebracht. Am nächsten Tage wieder NaOH bis zur deutlichen Reaktion auf Phenolphthalein hinzugegeben. Nach 8 Tagen dampft man die Lösung bis auf ca. 30 ml ein. Das pH ist ca. 7.5, Gesamt-N = 445 mg%, Amino-N = 141 mg%. Von dieser Lösung wurde den Versuchskulturen (1532) 0.1 ml hinzugesetzt, die auf das ganze Medium (2 ml) verteilt 7 mg% Amino-N ausmacht.

Während die Zellen der Kontrollkulturen 48 Stunden nach Beginn der Versuche stark von Vakuolen durchsetzt waren und sich nach 72 Stunden in Auflösung befanden, blieben die unter

der Einwirkung des abgebauten Serums stehenden Zellen 8 Tage lang völlig klar und aktiv. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen in andere Flaschen mit dem gleichen Medium überführt und in dieser Weise 4 Wochen gezüchtet. Dann wurden die Versuche eingestellt.

Ausser Aminosäuren enthielt dieses Präparat auch höhere Spaltungsprodukte, wie aus dem Verhältnis zwischen Gesamt-N und Amino-N hervorgeht. Da die Kulturen an Masse zunahmten, muss man annehmen, dass dies den höheren Polypeptiden zuzuschreiben ist, wie bekanntlich die Untersuchungen von BAKER und CARREL aufzeigten (1928). Wie später vorgeführt werden soll, bewirken die Aminosäuren allein unter diesen Versuchsbedingungen so gut wie gar keine Wachstumserhöhung. Sie halten vielmehr nur das Zelleben aufrecht, was in dem gesunden und normalen Aussehen der Zellen zum Ausdruck kommt. Das geht auch deutlich aus folgendem Versuch hervor:

Ein Teil des tryptisch verdauten Dialyseserums wurde weiterer Hydrolyse durch 15stündiges Kochen mit ca. 25 %  $H_2SO_4$  (1981—3) unterworfen. Nach Zusatz von Tryptophan (zum Ersatz für das bei der Säurehydrolyse zerstörte) hatte auch dieses Produkt ausgesprochen komplettierende Wirkung, jedoch keine eigentlich wachstumsfördernde Eigenschaft (1759).

Die gleiche komplettierende Wirkung besaßen auch andere mit Trypsin verdaute Proteine. So ergab kristallinisches Eialbumin ein aktives Produkt mit wachstumsfördernder Wirkung (1433). Dasselbe gilt für trypsinverdautes Ochsenblut, hergestellt nach BAKER und EBELING (1939), sowie für Globulin aus Hühnerserum (1347; 1399).

Diese orientierenden Untersuchungen gaben uns ein deutliches Bild davon, dass Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Zellebens spielen. Besonders lehrreich ist der Versuch, aus dem sich ergibt, dass das insuffiziente Dialyseserum in eine Form verwandelt werden kann, aus der die Zellen ihren N-Bedarf decken können, wenn es vorher mit Trypsin abgebaut wurde. Damit wird eindeutig bestätigt, dass die Zellen selber diesen Abbau nicht vorzunehmen vermögen.

Um eine bessere Vorstellung von der Bedeutung der Aminosäuren zu erlangen, haben wir ein paar grobe Fraktionierungen der Proteinstoffe, die entweder mit Trypsin oder durch Säurehydrolyse abgebaut waren, ausgeführt.

*Säurehydrolyse.*

V-13. 200 g getrocknetes Fibrin (Kahlbaum) wird 16 Stunden mit 750 ml Wasser und 250 ml konz. Schwefelsäure gekocht. Dann wird 2.4 l Wasser zugesetzt, filtriert, darauf pulverisiertes Ba(OH)<sub>2</sub> zugegeben, bis die Säure ziemlich beseitigt ist. Die Lösung wird filtriert; der Bodensatz mit Wasser gekocht, dann ebenfalls filtriert. Die Filtrate werden zusammen im Wasserbad im Vakuum auf 1.5 l eingedampft. Nochmalige Filtrierung. Unter vorsichtigem Zusetzen von Ba(OH)<sub>2</sub> wird der Rest der Schwefelsäure entfernt. Jetzt entnimmt man 5 ml, verdünnt sie mit 20 ml physiol. Kochsalzlösung und sterilisiert im Autoklaven. Die Fraktion bekommt die Bezeichnung V-13, ihr Gehalt an Total-N ist 241 mg%, an Amino-N 196 mg% (Total-N nach Kjeldahl, Amino-N nach van Slyke bestimmt).

V-19.1. Das Filtrat wird auf ca. 300 ml eingedampft, steht dann 24 Stunden bei 0° und wird darauf filtriert. Der Niederschlag wird in 500 ml warmen Wassers gelöst. Nach Filtrierung wird auf 150 ml eingedampft. Nach zweitägigem Stehen bei 0° wird filtriert. Eine Lösung hiervon in physiol. NaCl wird V-19.1 bezeichnet. Total-N = 48 mg%, Amino-N = 43 mg%.

V-19.2. Ausfällung von V-19.1 mit aktiver Kohle zur Entfernung der farbigen Begleitstoffe. Total-N = 10.4 mg%, Amino-N = 10.7 mg%.

V-21.1. Das Filtrat aus V-19.1 wird auf 200 ml eingedampft und bekommt einen Überschuss von Baryt. Hinzugegeben wird das vierfache Volumen 96 % Alkohol. Bleibt zwei Tage bei 0° stehen, wird filtriert, in 500 ml Wasser gelöst. Ein geringer Überschuss von Schwefelsäure kommt hinzu, dann Filtrierung. Der Überschuss an Schwefelsäure wird mit Baryt entfernt. Filtrierung, Eindampfung im Vakuum, Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum. Bezeichnung: V-21.1; Total-N = 230 mg%, Amino-N = 218 mg%.

V-21.2. Ausfällung von V-21.1 mit aktiver Kohle. Total-N = 113 mg%; Amino-N = 92 mg%.

V-23.1. Das Alkoholfiltrat aus V-21.1 wird mit Schwefelsäure schwach sauer gemacht. Filtrierung, Abdampfung des Alkohols im Vakuum. Vollständige Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt, Filtration, Eindampfung im Vakuum, Trocknen über Schwefelsäure. Bezeichnung: V-21.1; Total-N = 232 mg%, Amino-N = 188 mg%.

V-23.2. Ausfällung von V-23.1 mit aktiver Kohle. Total-N = 118 mg%, Amino-N = 98 mg%.

Die Wirkung dieser Lösungen auf die Gewebszellen im dialysiertem Medium kann folgendermassen kurz zusammengefasst werden: (allen Lösungen wurde Tryptophan als Ersatz für das bei der Säurehydrolyse zerstörte zugesetzt)

V-13: Von den verschiedenen Konzentrationen dieser Lösung erwies sich diejenige als die günstigste, die einem Gehalt von 7.8 mg% Amino-N, auf das ganze Medium berechnet, entsprach. In diesem Verhältnis hatte sie deutlich komplettierende Wirkung,



jedoch nur dann, wenn die Kulturen jeden zweiten Tag vier Stunden hindurch damit gewaschen waren (1505). Wirkte das Hydrolysat dauernd auf die Kulturen ein, wenn auch nur in schwacher Konzentration, so traten Anzeichen einer toxischen Wirkung auf.

V-19,1: Die in Wasser schwerlöslichen Aminosäuren übten eine deutliche Schutzwirkung auf die Zellen aus (1727).

V-21,1: Die in Wasser leichtlöslichen, in Alkohol aber schwerlöslichen Aminosäuren in einer Konzentration von 2.1 mg% Amino-N besaßen nur geringe Wirkung (1731).

V-23,1: Die in Wasser und Alkohol leichtlöslichen Säuren in einer Konzentration von 1.9 mg% Amino-N waren ohne Wirkung.

Die mit aktiver Kohle ausgefällten Fraktionen hatten praktisch genommen dieselben Wirkungen wie die vorstehend aufgeführten entsprechenden (2095; 2099; 2103).

Eine ganz ähnliche Reihe von Untersuchungen wurde mit trypsinverdautem, frisch ausgefälltem Ochsenfibrin vorgenommen.

V-32.1. 250 g frisch ausgefälltes Ochsenfibrin, durch Rekalzifizierung von Oxalatplasma gewonnen, wird mit 2.5 l Wasser und 10 g Trypsin (Merck) unter Zusatz von Ammoniak bei 37° C verdaut. Man setzt Toluol zu, filtriert nach drei Tagen und dampft im Vakuum auf ca. 900 ml ein, erwärmt 5 Minuten lang bis zum Kochen, kühlt ab und filtriert. Dann wird eine Probe entnommen, mit HCl neutralisiert und im Autoklaven sterilisiert.

Total-N = 670 mg%; Amino-N = 267 mg%.

V-32.3. 730 ml der Fraktion V-32.1 werden mit 43 ml 40%iger Trichloressigsäure versetzt und bleiben bis zum nächsten Tage stehen. Filtrierung und Abdampfung in offener Schale bis auf ca. 200 ml. Die nunmehr neutrale Lösung wird mit 200 ml Wasser verdünnt.

Total-N = 1137 mg%; Amino-N = 495 mg%.

V-32.4. Eindampfung bis auf 100 ml, Zusatz von 400 ml 96% Alkohol. Bleibt bis zum nächsten Tage stehen, dann Filtrierung, Abdestillierung des Alkohols, Zusatz von Wasser und erneute Destillierung.

Total-N = 1018 mg%; Amino-N = 410 mg%.

V-32.5. Der Niederschlag aus der Ausfällung mit Alkohol wird in 150 ml Wasser gelöst, dann Filtrierung, Trocknung des Niederschlages über Schwefelsäure. Hiervon wird eine Teil in Wasser gelöst.

Total-N = 34.2 mg%; Amino-N = 13.5 mg%.

V-32.6. Dem Filtrat aus den in Wasser schwerlöslichen Säuren (V-32.5) wird Wasser hinzugesetzt, der Alkohol abgedampft.

Total-N = 893 mg%; Amino-N = 433 mg%.

Diese Fraktionen besaßen folgende Wirkungen:

V-32.1: toxisch in einer Konzentration von 5.3 mg% Amino-N im Medium, nur geringe komplettierende Wirkung bei 2.0 und 2.6 mg% (1589).

V-32.3: Bei einer Konzentration von 2.4 mg% Amino-N im Medium wird deutlich komplettierende Wirkung beobachtet.

V-32.4: Bei einer Konzentration von 2.0 mg% Amino-N konnte klar erkennbare Wirkung festgestellt werden. Die Kultur wird fortgesetzt in mehreren Übertragungen gezüchtet.

## 5.

Der erste Versuch mit reinen Aminosäuren<sup>1</sup> umfasst folgende Mischung: l-Leucin, d-Glutaminsäure, d-Arginin, l-Cystin, l-Histidinmonohydrochlorid, Tyrosin,  $\beta$ Alanin und Tryptophan (1377). Von dieser Mischung wurden 0.5 ml, die in physiol. Kochsalzlösung gelöst und neutralisiert waren, den Kulturen zugesetzt, wobei die Konzentration, auf das ganze Medium berechnet, ca. 7 mg% Amino-N betrug. Das ist eine Konzentration, die so ziemlich der im Blute bestehenden entspricht. Eine konservierende Wirkung war so gut wie garnicht bei dieser Mischung zu erkennen. Darauf wurde sie in kleinere Gruppen geteilt und jede Mischung für sich geprüft.

Bei den folgenden 5 Aminosäuren: Tyrosin, Leucin, Glutaminsäure, Cystin und Arginin stellte sich heraus, dass sie eine ganz geringe komplettierende Wirkung besaßen (1409). Während die Kontrollkulturen 48 Stunden nach Versuchsbeginn in Auflösung gerieten, waren die Zellen der Versuchskulturen recht gut erhalten, wenn auch das Protoplasma am 5. Tage nach Versuchsbeginn grobe Körnung aufwies.

Darauf wurden dieselben Aminosäuren geprüft, das Cystin (1415) aber ausglassen. Hierbei zeigte sich nicht nur völlige Wirkungslosigkeit, sondern sogar eher noch eine Beschleunigung aller Zerfallserscheinungen.

Bisweilen versuchten wir, die Kulturen zu regenerieren, also wieder zum Wachsen zu bringen, um dadurch festzustellen, ob die Zellen noch am Leben waren oder nicht. Diese Probe bildet eine wertvolle Ergänzung zu der über die morphologischen Veränderungen der Zellen.

Die Regenerationsprobe wird in der Weise ausgeführt, dass man den Versuch abbricht und den betreffenden Kontroll- und Versuchskulturen an Stelle des Versuchsmediums *nicht dialysiertes* frisches Serum und frischen Embryonalextrakt zusetzt. Die

---

<sup>1</sup> Für liebenswürdige Überlassung einiger der benutzten Aminosäuren sprechen wir der Firma Hoffman-La Roche, Basel, unseren Dank aus.

Wirkung wird mehrere Tage lang beobachtet. Sind die Kulturen am Leben, so werden die Zellen schnell ihr Aussehen verändern und anfangen, lebhaft zu wachsen.

Folgende Mischung von 9 Aminosäuren wurde in drei verschiedenen Konzentrationen versucht: d,1-Valin, 1-Leucin, d,1-Isoleucin, d-Lysindihydrochlorid, Tryptophan, Histidinmonohydrochlorid, Phenylalanin, Methionin und Arginin (1605). Die Konzentration der Lösung betrug 21 mg% Amino-N (A.-N). Es zeigte sich so gut wie gar keine Komplettierungswirkung der Mischungen in einer der gewählten Konzentrationen: 1.0; 2.1 und 4.2 mg% A.-N im Medium. In der Konzentration von 4.2 mg% war die Wirkung eher eine toxische.

Folgende Mischung von Aminosäuren hatte unzweifelhaft komplettierende Wirkung: Cystin, Histidin,  $\beta$ Alanin und Tryptophan, (1421; 1617). Der Versuch wurde ausgeführt mit drei Konzentrationen dieser Mischung, die 35 mg% A.-N enthielt. In der Konzentration 1.7 mg% A.-N hielten die Kulturen 8 Tage aus, während die entsprechenden Kontrollen am vierten Tag in voller Auflösung waren. Der Regenerationstest am 10. Tag war bei den Kontrollen negativ, bei den Versuchskulturen stark positiv. In den Konzentrationen 3.5 mg% A.-N waren die Kontrollen am 4.—5. Tag in Auflösung, die Versuchskulturen am 5.—6. Tag. Der Regenerationstest am 8. Tage war negativ bei den Kontrollen, positiv bei den Versuchskulturen. In der Konzentration 5.2 mg% A.-N waren die Kontrollen am 5.—6. Tag in Auflösung, die Versuchskulturen am 6.—7. Tag. Die Regenerationsprobe am 8. Tag fiel bei den Kontrollen nach 6 Tagen schwach positiv aus, bei den Versuchskulturen nach 2 Tagen stark positiv. Daraus wird ersichtlich, dass die Konzentration der benutzten Aminosäuren eine grosse Rolle spielt. Bei 1.7 mg% A.-N im Medium zeigte sich bessere und länger anhaltende Schutzwirkung als bei den höheren Konzentrationen. Dieses Verhältnis haben wir bei allen Versuchen mit Aminosäuren beobachtet. Die Zellen können recht empfindlich sein gegenüber stärkeren Konzentrationen, denen eine direkte toxische Wirkung inneohnt.

Nachdem wir gesehen hatten, dass die Wirkung der vier benutzten Aminosäuren in der Mischung zwar deutlich erkennbar aber durchaus noch nicht gut war, untersuchten wir eine Mischung von zwei Aminosäuren und danach die Wirkungen der einzelnen. Cystin und  $\beta$ Alanin in der Konzentration von 1.7 mg% A.-N im

Medium hatten eine ganz besonders günstige Wirkung auf die Versuchskulturen. Die Zellen behielten klares und gesundes Aussehen bis zum 10. Tag, während die der Kontrollen am 2.—3. Tag in Auflösung gerieten. Die Regenerationsprobe erbrachte Übereinstimmung mit dem morphologischen Bild, indem die Kontrollen am 6. Tag inaktiv waren, während die Versuchskulturen zu der gleichen Zeit grosse Wachstumstätigkeit zeigten.

Cystin alleine in der Konzentration von 1.7 mg% A.-N (1679) weist deutliche, wenn auch geringe Schutzwirkung auf.  $\beta$ Alanin in der gleichen Konzentration ist gänzlich wirkungslos (1683).

Dass wir den Versuch mit einer  $\beta$ Aminosäure machten, geschah aus zweierlei Gründen. Erstens gingen wir von dem Befunde NIELS NIELSENS aus, wonach  $\beta$ Alanin Bedeutung als Wuchsstoff für Hefe besitzt und indirekt dadurch zu wirken scheint, dass es die Autolyse der Zellen fördert, wenn sie eine gewisse Entwicklungsstufe erreicht haben. Zweitens haben wir gemeint, dass diese  $\beta$ Säure von Wert für den Aufbau der Pantothersäure sein kann, zu deren Bestandteilen sie bekanntlich gehört.

Die ergänzende Wirkung der reinen Aminosäuren ist offensichtlich nicht allein von der qualitativen Zusammensetzung abhängig, sondern auch von der Konzentration der einzelnen Säuren in der Mischung.

Da keine Angaben über die quantitativen Verhältnisse vorliegen, unter denen die einzelnen Aminosäuren im Blut vorkommen, und da wir vermuten dürfen, dass sie eine entscheidende Rolle spielen können, haben wir eine Mischung hergestellt, in der die Säuren in den Mengenverhältnissen vertreten sind, wie BERGMANN und NIEMANN (1936) sie bei quantitativen Analysen von Fibrin gefunden haben. Es handelt sich um 9 Aminosäuren, die sie quantitativ isolieren konnten.

Wir stellten in physiol. Kochsalzlösung (V. 35) eine Mischung her, die die 9 Aminosäuren in demselben Mengenverhältnis, wie sie im Fibrin vorkommen, enthält.

Es wurden abgewogen:

Tab. 2.

d-Lysindihydrochlorid . . . . .	15.1 mg
d-Arginin . . . . .	7.7 "
1-Tryptophan . . . . .	5.0 "
d, 1-Methionin . . . . .	2.6 "
1-Histidinmonohydrochlorid . . . . .	3.1 "
Glutaminsäure . . . . .	14.1 "
1-Asparaginsäure . . . . .	5.9 "
1-Prolin . . . . .	5.1 "
1-Cystin . . . . .	1.5 "

Diese 60.1 mg Aminosäuren wurden unter Neutralisation in 25 ml physiol. Kochsalzlösung gelöst und im Autoklaven sterilisiert. Der Gehalt der Lösung an Total-N beträgt 31 mg%, der an Amino-N = 22.2 mg%.

Hiermit wurden in folgenden drei Konzentrationen Versuche angestellt: 1.1; 2.2 und 4.4 mg% A.-N, berechnet auf das ganze Züchtungsmedium von 2 ml (1695).

1.1 mg%: Die Kontrollkulturen waren 1—2 Tage nach Versuchsbeginn in Auflösung. Die Versuchskulturen zeigten nach 9 Tagen klare und aktive Zellen. Übereinstimmend hiermit waren die Regenerationsproben am 5. und 9. Tage negativ bei den Kontrollen, stark positiv bei den Versuchskulturen; 2.2 mg% und 4.4 mg%: Kontrollkulturen am 2. Tag in Auflösung, Versuchskulturen noch nach 9 Tagen mit klaren und aktiven Zellen. Die Regenerationsprobe 5 Tage nach Beginn des Versuchs war nach 48 Stunden negativ bei den Kontrollen, positiv bei den Versuchskulturen.

Diese Versuche zeigen eine kräftige und deutlich ergänzende Wirkung der genannten Aminosäuren und lassen keinen Zweifel zurück, dass sie von den Zellen ausgenutzt werden, ebenso auch, dass zu sehr grossem Teil ihr Fehlen im dialysierten Serum die Ursache zu dem beinahe augenblicklichen Stillstand im Wachstum und dem dann folgenden Eingehen der Zellen ist.

Einen wie grossen Anteil im besonderen das quantitative Verhältnis zwischen den einzelnen Aminosäuren der Mischung auf die Wirkung hat, kann hieraus nicht entschieden werden. Da es von Wichtigkeit sein dürfte, darüber Klarheit zu gewinnen, stellten wir eine Lösung der 9 Aminosäuren in physiol. Kochsalz her, diesmal jedoch mit dem Unterschied, dass sie alle in derselben Gewichtsmenge von je 5 mg darin enthalten waren. Diese 45 mg wurden unter Neutralisation in 30 ml physiol. Kochsalz gelöst. Dabei wird die Gewichtsmenge der schwerlöslichen Säuren etwas grösser, die einiger der leichtlöslichen geringer. Total-N der Lösung ist 23 mg%, A.-N = 14 mg%.

Diese Mischung wurde den Versuchskulturen in einer Konzentration zugesetzt, die 2.1 mg% A.-N, auf das Gesamtmedium berechnet, entspricht. Im Vergleich mit der gleichen Mischung Aminosäuren in dem vorher angegebenen Verhältnis war die Wirkung erstaunlich schlecht. Am 4. Tag waren die Kontrollen, am 5. die Versuchskulturen in Auflösung. Die Regenerations-

In other experiments we have been able to show that these small pressure impulses closely follow the intrasinus pressure and may appear in great numbers (Fig. 5). The latter fact speaks in favour of the assumption that these fibres may play a dominating rôle in the production of the reflex pressure responses. We have no evidence that either the large or the small pressure impulses are increased by synaptotropic substances. On the contrary, doses of lobeline which are known to elicit a strong response from the chemical fibres have no effect on the impulse frequency in the pressure fibres of either kind. The inference is drawn from this fact that the pressor fibres are not transmitted in a synaptic way, as are the chemoreceptor impulses.

#### IV. The Course of Chemical and Pressor Fibres in the Carotid Sinus Nerve.

It has been shown in the present and foregoing papers that the chemical sensitivity of the receptors of the carotid sinus applies to two distinct groups of substances, 1) causing a shift in the reaction of the structures serving as receptors to the acid side, either by means of direct action or by factors which impair the normal oxydation rate, and 2) substances belonging to the synaptotropic group, such as nicotine, lobeline, acetylcholine, or K-ions. The action of the second group of substances can be discriminated from the first group, e. g. by means of an alkali, such as ammonia. Two principal possibilities present themselves as regards the actual arrangement of the synapse. Either the ganglionic cells in the sinus region send axones which pass in to the sinus nerve and make a synapse between the receptor proper and the ganglion cell, or the ganglionic cells have a synaptic junction with sensory nerve fibres running in the sinus nerve and having their cell in the petrous ganglion, or else centrally to the point of adjunction to the glossopharyngic nerve.

In order to elucidate this point we cut the sinus nerve in two cats under ether anaesthesia and examined the nerve centrally and peripherally to the place of interruption. All the nerve fibres below the lesion were found to be degenerated, whereas the central part revealed a normal picture. We conclude from this that the synaptic junction must be formed centrally to the sinus ganglionic cells. Whether the physiological receptors belong to the ganglionic cell itself or constitute a special structure we cannot

probe am 6. Tag zeigte übereinstimmend, dass Kontroll- und Versuchskulturen abgestorben waren.

Erfahrungen aus den ersten orientierenden Untersuchungen über die Wirkungen reiner Aminosäuren lenkten unsere Aufmerksamkeit auf das Cystin. Diese Säure alleine besass eine gewisse Wirkung, und diese Wirkung wurde verstärkt durch andere Säuren, die für sich allein wirkungslos waren. Wir stellten daher eine Aminosäuremischung in demselben Verhältnis nach BERGMANN (Tab. 2), aber ohne Cystin, her, ausserdem eine Lösung von Cystin allein. Die Konzentration der beiden Lösungen wurde so gewählt, dass sie zu gleichen Teilen gemischt die vorher besprochene Aminosäurelösung ergaben.

Eine Wirkung der BERGMANNMischung ohne Cystin und in derselben Konzentration im Medium wie vorher, nämlich 2.2 mg% A.-N, blieb nicht allein völlig aus, sondern es zeigte sich im Gegenteil eher, dass die Versuchskulturen schneller der Autolyse verfielen als die Kontrollen. Der Regenerationstest am 6. Tage (2131) verlief sowohl für Kontrolle wie für Versuchskultur negativ.

Setzt man dem »BERGMANN-Rest« Cystin zu, so wird die komplettierende Wirkung wieder hergestellt (2135). In Übereinstimmung hiermit ergab der Regenerationstest am 6. Tage bei den Kontrollen negatives, bei den Versuchskulturen positives Resultat.

Bei anderen Versuchen wurde Cystein anstatt Cystin dem BERGMANN-Rest zugegeben. Auch diese Mischung übte komplettierende Wirkung aus, vielleicht sogar noch besser als die mit Cystin (2139).

Selbst bei einer Erhöhung der Cystinkonzentration in der BERGMANNMischung um das 4—5fache bleibt die ergänzende Wirkung ständig gut (2205). Sogar eine Mischung mit einem 5mal grösseren Cystingehalt wurde bei einer Konzentration von 3.3 mg% A.-N im Medium geprüft. Die Wirkung war vollauf so gut wie die in früheren Versuchen mit der vollständigen BERGMANNMischung. Wir werden weiter unten auf eine Besprechung der Cystinwirkung zurückkommen.

ROSE und seine Mitarbeiter (1938) haben als Erste erfolgreiche Versuche durchgeführt, junge Tiere zum Wachsen bei einer Kost zu bringen, die reine Aminosäure als einzige N-Quelle enthielt. Diese Versuche sind auch noch deshalb von Interesse, weil sie zur Entdeckung einer neuen Aminosäure führten, nämlich des Threonin, das  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxy-n-Buttersäure darstellt. Aus den

Arbeiten ROSES geht hervor, dass die Mischung 10 Aminosäuren enthält, die man als unentbehrlich für den wachsenden tierischen Organismus ansieht. Das Cystin ist nicht darin enthalten, wohl aber Methionin, das nach ROSE als unentbehrliche Aminosäure zu bezeichnen ist. Abgesehen davon, dass der Organismus das Methionin als solches verbraucht, kann er aus ihm auch das für die Deckung seines Bedarfs erforderliche Cystin bilden.

Die Annahme lag nahe, dass ROSES Zusammensetzung diejenigen Aminosäuren enthalten müsste, die unserem insuffizienten Züchtungsmedium für Gewebszellen als Ergänzung dienen. Auf der andern Seite musste man sich von vornherein über Eins im Klaren sein: wenn diese kleine Anzahl Säuren auch ausreichend für einen ganzen komplizierten Organismus ist, so braucht sie es nicht unbedingt auch für jeden beliebig herausgegriffenen Gewebszellentypus zu sein. Wir wissen, dass etliche Aminosäuren für den Organismus entbehrlich sind, weil er sie selber aus jener Mindestzahl Aminosäuren aufbauen kann, die nach den Untersuchungen ROSES als unentbehrlich anzusehen sind.

Wir verfügten nicht über die von ROSE entdeckte neue Aminosäure Threonin, und so wurde sie in unserem Laboratorium von meinem Assistenten, Ingenieur T. ASTRUP synthetisch hergestellt. Ausser der d- und l-Form enthielt das Präparat eine geringe Menge Allothreonin.

Von ROSES Aminosäuremischung stellten wir eine Lösung her; die einzelnen Säuren waren in demselben Konzentrationsverhältnis darin vorhanden, wie ROSE sie bei seinen Tierversuchen als wirksam gefunden hatte.

d-Lysinhydrochlorid . . . . .	15 mg
d, l-Valin . . . . .	14 »
l-Leucin . . . . .	9 »
d, l-Isoleucin . . . . .	10 »
d, l-Threonin . . . . .	12 »
l-Tryptophan . . . . .	2 »
l-Histidinmonohydrochlorid . . . . .	5 »
Phenylalanin . . . . .	7 »
d, l-Methionin . . . . .	6 »
d-Arginin . . . . .	2 »

Diese Mischung, im ganzen 82 mg, wird in 20 ml physiol. NaCl-Lösung gelöst, neutralisiert und im Autoklaven sterilisiert. Amino-N ca. 27 mg%. In den Konzentrationen 0.8; 2.7 und 3.4 mg%



A.-N, berechnet auf das ganze Medium, war die Mischung *gänzlich wirkungslos*. Die Regenerationsprobe am 5. Tag verlief sowohl für Kontroll- wie für Versuchskulturen negativ (1939; 2029). Eigenartigerweise blieb die Wirkung auch dann aus, wenn Cystin in derselben Menge, in der es in der BERGMANNMischung vorhanden ist, zugesetzt worden war (2115; 2167).

Die halbe Anzahl der Aminosäuren ROSES findet sich auch in der BERGMANNMischung. Darum wurden zwei verschiedene Lösungen hergestellt: die eine enthielt die sowohl in ROSES wie in BERGMANN'S Mischung vorhandenen, die andere die nur in der BERGMANNMischung angegebenen Aminosäuren.

Lösung der für ROSES und BERGMANN'S Mischung gemeinsamen Aminosäuren:

d-Lysinhydrochlorid . . . . .	15.1 mg
d-Arginin . . . . .	7.7 »
l-Tryptophan . . . . .	5.0 »
l-Histidinmonohydrochlorid . . . . .	3.1 »
d, l-Methionin . . . . .	2.6 » —

Diese 33.5 mg werden in 12.5 ml physiol. NaCl-Lösung unter Neutralisation gelöst. Total-N = 33 mg%; Amino-N = 25 mg%.

Die Konzentrationen 1.2 und 2.5 mg% im Medium waren *ohne Wirkung* (1999; 2047 und 2123).

Wird dieser inaktiven Zusammensetzung, die der ROSE- und BERGMANNMischung gemeinsam ist, Cystin zugegeben, so wird eine gute komplettierende Wirkung erreicht. Die Konzentration im Medium war 1.2 mg% A.-N. In Übereinstimmung hiermit war der Ausfall der Regenerationsprobe am 6. Tage negativ bei den Kontrollen, positiv bei den Versuchskulturen (2051).

Lösung der nur in der BERGMANNMischung vorhandenen Aminosäuren:

d-Glutaminsäure . . . . .	14.1 mg
l-Asparaginsäure . . . . .	5.9 »
l-Prolin . . . . .	5.1 »
l-Cystin . . . . .	1.5 »

Diese insgesamt 26.6 mg Säuren werden in 12.5 ml physiol. NaCl-Lösung gelöst. Total-N = 24 mg%; Amino-N = 20 mg%. Mit dieser Mischung in 2.0 mg% Amino-N wurde ausserordentlich gute komplettierende Wirkung erzielt. Die Zellen hielten sich 8 Tage klar und aktiv, während die Kontrollen am 4.—5.

Tag in Auflösung waren. Am 8. Tage bei ihnen ausgeführte Regenerationsprobe verblieb negativ nach 5 Tagen, die Versuchskulturen dagegen zeigten starke Aktivität nach 3 Tagen (2005).

Wie wir sahen, bewirkt ein Zusatz von Cystin zu den der BERGMANN- und ROSEMischung gemeinsamen Aminosäuren, dass das Medium komplettiert wird. Aus diesem Grunde wurde nun auch untersucht, ob die drei übrig bleibenden Aminosäuren, also die nur in der ROSEMischung vorhandenen, gleichfalls solche Wirkung besitzen.

Der Versuch wurde angestellt mit den der BERGMANN- und ROSEMischung gemeinsamen Aminosäuren, indem dieser Zusammensetzung jeweils Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Prolin zugefügt wurde (2057; 2063; 2069). Keine dieser drei Mischungen ergab irgendwelche Anzeichen komplettierender Wirkung.

Inzwischen wurden Versuche darüber angestellt, inwieweit eine einzelne Aminosäure in starkem Überschuss die sonst vorhandene komplettierende Wirkung der vollständigen BERGMANNmischung zu unterdrücken vermag. Wie schon erwähnt, verändert Cystin, selbst in grossem Überschuss über den in der BERGMANNmischung gegebenen Gehalt hinaus, deren Wirkung nicht. Es wurden zwei Lösungen der vollständigen BERGMANNMischung hergestellt; in der einen war die Menge des Methionins, in der andern die des Histidins auf das Fünffache erhöht. Beide Mischungen zeigten deutlich komplettierende Wirkung, wobei die mit Methioninzusatz (2149) vielleicht etwas schwächer war als die mit Histidin (2143). Auffallend grossen Einfluss hatte also der erhöhte Gehalt an einer der Aminosäuren nicht.

Es bestand natürlich noch die Möglichkeit, die Unwirksamkeit der ROSEMischung damit zu erklären, dass die synthetisch hergestellte Aminosäure Threonin toxische Verunreinigungen enthielt. Um das zu klären, wurde Threonin der vollständigen BERGMANNmischung zugesetzt (2201). In der Konzentration 2.2 mg% A.-N im Medium war die komplettierende Wirkung nicht voll so gut wie ohne Threonin. Das könnte man als Zeichen dafür ansehen, dass in dieser Säure Verunreinigungen vorhanden wären, die z. T. für die herabgesetzte Wirkung der Gesamtmischung verantwortlich zu machen sind. Aber diese Verunreinigungen sind doch kaum gross genug, um für die völlige Inaktivität der ROSEMischung als Erklärung dienen zu können.

Aus diesen Befunden geht deutlich hervor, dass die komplettierende Wirkung an die Anwesenheit von Cystin gebunden ist.

Und weiter ist ersichtlich, dass die benutzten Gewebszellen nicht imstande sind, das Methionin zu entmethylieren. In diesem Zusammenhang soll gleich bemerkt werden, dass ein stark schwefelhaltiges Protein wie Insulin das Cystin ersetzen kann. Sowohl das genuine Insulin wie auch das durch Kochen inaktivierte vermag vollständig an die Stelle des Cystins in der BERGMANNMischung zu treten (2227). Auf diese Verhältnisse soll noch weiter unten eingegangen werden.

## 6.

Bevor wir die Beschreibung unserer Untersuchungen über die komplettierende Wirkung der Aminosäuren auf Gewebszellen im insuffizienten Züchtungsmedium abschliessen, soll noch kurz von einigen Versuchen über die Wirkung von Zucker und Eiweiss berichtet werden. In allen hier beschriebenen Versuchen sind Plasma, Serum und Embryonalextrakt gegen Ringerlösung mit 0.1 % Glukosegehalt dialysiert worden. Ferner sind dem Dialyseplasma und -serum 25 % Tyrode zugesetzt worden, um Bikarbonat, Phosphat und Magnesium zuzuführen.

Eine Reihe Untersuchungen wurde nun unternommen, die sich auf die komplettierende Wirkung der angeführten Aminosäuren sowie von trypsinverdaulichem Protein in zuckerfreien Dialysemedien beziehen sollten. In diesen Fällen wurden die Kulturen mit zuckerfreier Tyrodeflüssigkeit gewaschen. Vergleichen wir die Wirkungen eines Dialyseserums mit und ohne Zucker, so sehen wir, dass die Auflösung der Zellen im zuckerfreien Medium bereits 24 Stunden nach Versuchsbeginn erfolgt (1927). Züchten wir sowohl Kontroll- wie auch Versuchskultur in einem zuckerfreien Dialyseserum, setzen jedoch letzterem ausserdem BERGMANN'S Aminosäuremischung hinzu, so finden wir, dass die Aminosäuren doch imstande sind, das Absterben der Kulturen um 2—3 Tage hinauszuziehen. In Übereinstimmung hiermit war der Regenerationstest, am 5. Tage ausgeführt, bei den Kontrollkulturen negativ, bei den Versuchskulturen stark positiv (2035). Daraus scheint hervorzugehen, dass Aminosäuren unter den Versuchsbedingungen z. T. zuckersparend wirken können.

Noch auf einen andern Punkt mag hier gleich eingegangen werden, das ist die Wirkung des Proteins. Unsere Untersuchungsbefunde zeigen mit aller Deutlichkeit, dass die Zellen nicht imstande sind, das Protein im dialysierten Plasma oder Serum

abzubauen. Trotzdem stellten wir einige Versuchsreihen mit wechselnden Konzentrationen des Dialyserserums auf (2179). Sowohl den Kontrollen wie den Versuchskulturen wurde die vollständige BERGMANN-Aminosäuremischung zugesetzt, die 2.2 mg% A.-N im Medium ausmachte. Alle Kontrollen bekamen gleichmässig 0.5 ml unverdünntes Dialyserserum, die Versuchskulturen 0.5 ml Dialyserserum, in verschiedenen Abstufungen mit Tyrode verdünnt. In der Konzentration von 10 % Serum waren die Zellen 24 Stunden nach Versuchsbeginn in Auflösung; bei 25 % Serum nach 2—3 Tagen; bei 40 % Serum nach 4 Tagen. Die Zellen in den Kontrollen blieben über diese Perioden hinaus klar und aktiv.

Diese hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Eiweisskonzentrationen war recht überraschend und ist wohl nur auf die Weise zu deuten, dass sich hier eine Verschiebung im DONNAN-Gleichgewicht geltend macht. Nicht allein wird der kolloid-osmotische Druck in den Zellen grösser, sondern es steigt gleichzeitig damit auch die Elektrolytkonzentration. In Verbindung hiermit wird der intrazelluläre Druck recht gross, was dadurch zum Ausdruck kommt, dass die Zellen leicht platzen und sich auflösen.

Schliesslich soll noch kurz die Bedeutung des eigentlichen tierischen Wuchsstoffes in Verbindung mit den komplettierenden dialysierbaren Stoffen, Aminosäuren, Polypeptiden u. a. besprochen werden. Die Wuchsstoffe finden sich bekanntlich in allen Gewebszellen, namentlich in den stark wachsenden embryonalen. Dialysieren wir den embryonalen Gewebsextrakt in der gleichen Weise wie Plasma und Serum gegen Glukose-Ringer, so verliert er vollständig die Fähigkeit, in einem sonst dialysierten Medium Wachstum hervorzurufen oder auch nur die Gewebszellen zu konservieren. Darüber haben wir eine Menge Versuche angestellt, die alle eindeutig in diesem Sinne ausfielen. Damit haben wir eine erneute Bestätigung für die Annahme, dass der Wuchsstoff nicht energieliefernd ist, sondern dass seine Wirkung in der eines Katalysators besteht. Nur bei Vorhandensein der angegebenen komplettierenden, dialysierbaren Stoffe kann der Wuchsstoff seine Wirkung entfalten. Man könnte die wichtigen komplettierenden, dialysierbaren Stoffe als notwendige Kofaktoren des Wuchsstoffes bezeichnen, aber da die dialysierbaren Stoffe, Abbauprodukte des Proteins, Zucker und vielleicht noch weitere, zu den einfachen Nährstoffen gezählt werden müssen, und in

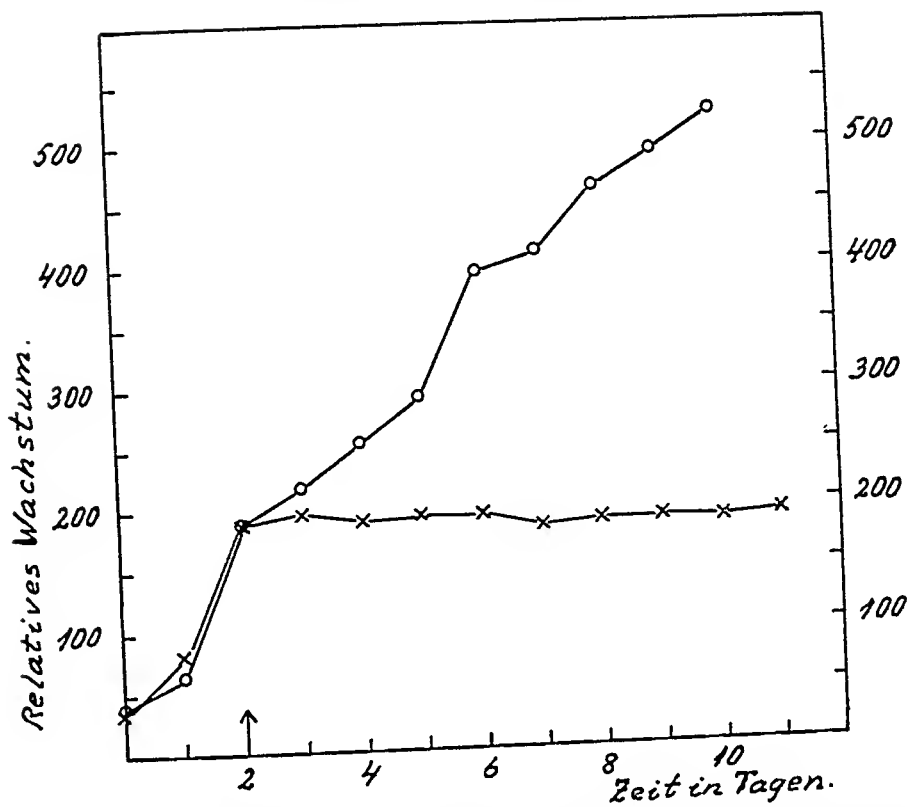


Abb. 5. x = Dialyseserum + dialysierter Embryonalextrakt; o = frisches Serum + dialysierter Embryonalextrakt; Ordinate = relatives Wachsen; Abszisse = Zeit in Tagen.

dieser Eigenschaft von vitaler Bedeutung für die Zellen sind, würde es doch unrichtig sein, sie mit solchen Namen zu belegen. Wenn den Zellen der zur Erhaltung des Lebens erforderliche Brennstoff fehlt, nützt es nichts, sie zum Wachstum anpeitschen zu wollen. Einige vereinzelte Versuchsbeispiele, die hier vorgelegt werden sollen, dürften das klar genug beweisen.

Abb. 5 zeigt das Wachsen zweier Kulturhälften in genau gleichen Medien, in beiden Fällen mit Zusatz von dialysiertem Embryonalextrakt. Nach Verlauf von 48 Stunden wird den Kontrollkulturen Dialyseserum, den Versuchskulturen frisches Serum zugesetzt, ausserdem beiden dialysierter Hühnerembryonalextrakt. Während bei den Versuchskulturen das Wachstum weitergeht, hört es bei den Kontrollen jäh auf (1739).

Abb. 6 zeigt ein anderes Beispiel (1427). Der Kontrollkultur ist Dialyseserum, der Versuchskultur frisches Normalserum zugesetzt. Beide erhielten auch ein wenig fraktioniertes Kalbs-embryonalextrakt (1, 2), ein Nukleoprotein ohne Gehalt an dia-

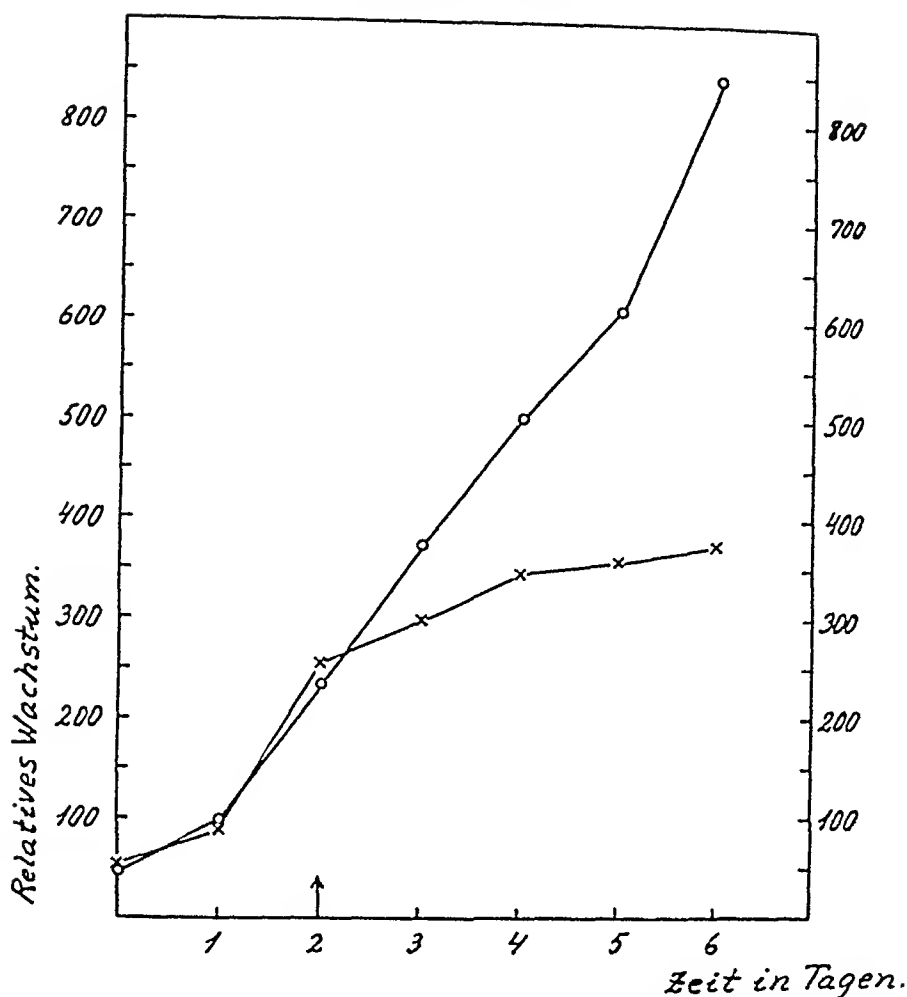


Abb. 6. x = Dialyseserum + Nucleoprotein aus Kalbsembryonalextrakt; o = frisches Serum + Nucleoprotein aus Kalbsembryonalextrakt.

lysierbaren Stoffen. Man erkennt hier denselben grossen Unterschied in der Wirkung. Im frischen Serum geht das Auswuchern sehr schnell weiter, bei den Kulturen im Dialyseserum ist es praktisch zum Stillstand gekommen.

Endlich soll noch an einem andern Beispiel die Wirkung des dialysierten Embryonalextraktes vorgeführt werden. Es handelt sich um zwei Kulturhälften, die in genau übereinstimmenden Medien aus dialysiertem Serum und dialysiertem Embryonalextrakt gezüchtet wurden, mit der einzigen Abweichung, dass der Kontrolle die vollständige BERGMANN-Aminosäuremischung in der Konzentration von 2.2 mg% A.-N im Medium zugesetzt wurde. Die Wuchskurven beider Hälften sind in Abb. 7 ersicht-

lich (2021). Während die Kontrolle wächst, weil sie sowohl komplettierende Aminosäuren als auch Wuchsstoff bekommen hat, trifft das bei den nur mit Wuchsstoff versorgten Versuchskulturen nicht zu. Ohne Embryonalextrakt wachsen die Kulturen mit den Aminosäuren nicht oder doch nicht so, dass es der Rede wert wäre. Die einzige Wirkung der Aminosäuren besteht darin,

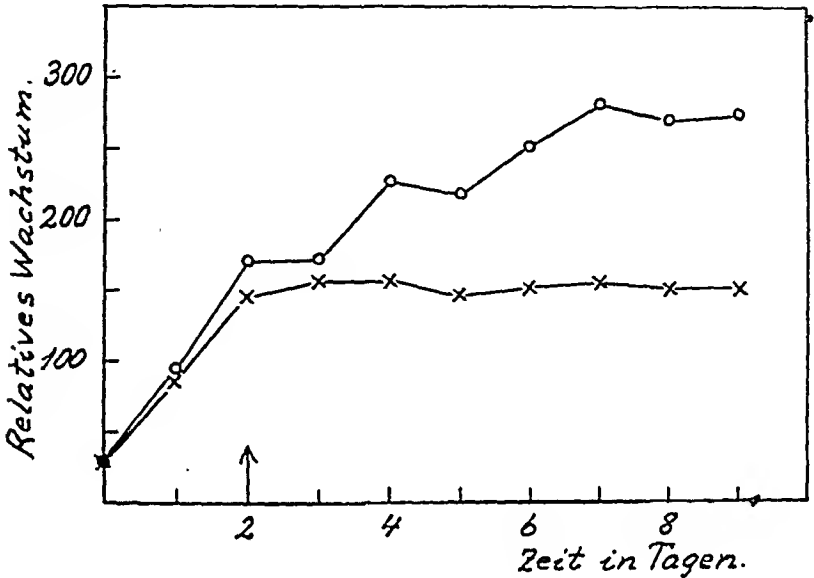


Abb. 7. Erklärung im Text.

dass sie das Leben der Zellen aufrechterhalten. Zum Ausdruck kommt das u. a. in dem gesunden Aussehen der auch sonst gut erhaltenen Zellen.

## 7.

Im Vorhergehenden haben wir die Wirkung der Ergänzungsstoffe auf das Wachsen der Zellen in einem insuffizienten Züchtungsmedium, dessen Insuffizienz durch Auswaschung und Dialyse seiner Bestandteile hervorgerufen war, beschrieben. Bei der im Einzelnen angegebenen Technik wurden zum grossen Teil die morphologischen Veränderungen der Zellen, daneben bisweilen auch der Regenerationstest, als Massstab für die komplettierenden Eigenschaften der untersuchten Stoffe benutzt. Nunmehr soll kurz von den Komplettierungsversuchen berichtet werden, die mit der anderen einleitend erwähnten Technik ausgeführt wurden. Bei dieser werden die Gewebstücke in ein Medium gebracht, dessen sämtliche Bestandteile dialysiert worden sind, ehe sie für die Versuche benutzt werden. Heparin-Dialyseplasma wird mit

dialysiertem Embryonalextrakt zur Gerinnung gebracht, wobei die flüssige Phase aus Dialyseserum besteht.

Aus den beschriebenen Untersuchungen ging hervor, dass die zu den Versuchen angewandten periostalen Fibroblasten nicht imstande waren, die Eiweissstoffe des Mediums abzubauen. Ein Zeichen dafür war das jähe Aufhören des begonnenen Wachstums bei Beginn des Versuches, das schrittweise Zugrundegehen der Zellen durch Autolyse, und schliesslich die Tatsache, dass die Lebensdauer der Zellen unter Bewahrung ihres normalen gesunden Aussehens verlängert werden konnte, wenn Eiweissabbauprodukte zugesetzt wurden.

Das lässt sich noch schlagender beweisen, wenn das gänzlich dialysierte Medium — mit der notwendigen Menge an Zucker und Salzen — benutzt wird. Jegliches Wachsen bleibt aus, und die ausgeschnittenen seharfrandigen Gewebstücke bleiben unverändert in den Kulturen. Ein überzeugenderer Ausdruck für die Unzulänglichkeit eines derartigen Mediums kann nicht geboten werden.

Damit haben wir die Voraussetzungen, die eine Klassifizierung der verschiedenen Gewebszellentypen des Organismus hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Eiweissabbau ermöglichen. Können sie das leisten, so wird ein Wachsen der Zellen vor sich gehen. Vorläufig sind einige orientierende erste Versuche über diese Frage gemacht worden, für später sind besondere Untersuchungsreihen vorgesehen. Die bei diesen Arbeiten als Versuchsobjekte benutzten Fibroblasten — es waren solche aus subkutanem Bindegewebe sowie Herzfibroblasten — sind ausserstande, in einem solchen insuffizienten Medium zu wachsen. Dagegen vermag Darmepithel, Chorionepithel und vielleicht, aber nicht sicher, Hautepithel, es mehr oder weniger gut. Ebenso zeigte Rouss' Hühnersarkom etwas Wachstum. Legen wir Kulturen der periostalen Fibroblasten unmittelbar neben ein kleines Stückchen Darmgewebe mit Darmepithel, Chorionepithel oder Sarkomzellen, so beobachten wir ein Wachsen auch dieser Zellen, die alleine sonst nicht in derartigem Medium wachsen können. Wie erwartet, ist das Darmepithel fähig, das ihn umgebende Medium zu verdauen. Dadurch kann es dann wieder zur Bildung von Produkten Anlass geben, die von Zellen ausgenutzt werden, die selber nicht die Proteine anzugreifen vermögen.

Um es mit einer Klarheit festzulegen, die keinerlei Zweifel mehr zurücklässt, dass die Gewebszellen Aminosäuren ausnutzen kön-



state with certainty, but the latter possibility seems more likely in view of the specific sensitivity to alterations in the blood chemistry. We might then look upon the sinus region as a sort of "nervous centre" with a peripheral localization, of the same general type as in the olfactory or optic peripheral organ.

In the case of the pressure fibres there is at present no reason to assume any other arrangement than that for peripheral receptors in general.

### Summary.

1. In the sinus nerve of the cat small impulses have been demonstrated, which respond to variations in the intrasinus pressure but are insensitive to chemical stimuli, such as oxygen want, carbon dioxide, and synaptotropic substances in non-paralyzing concentrations.

2. Higher concentrations of nicotine or lobeline suppress the pressure reflex of the carotid sinus and also do away with the small pressure impulses, whereas the large spikes seem to be more resistant to the paralyzing action of these drugs.

3. In view of the small number of big pressure impulses as compared with the small ones, the latter are considered to be of greater importance for the sinus pressure reflexes.

This work has been aided by a grant from the Therese and Johan Andersson Memorial Foundation.

### References.

- BOGUE, J. Y. and G. STELLA, *J. Physiol.* 1934. 82. 23.  
 BRONK, D. W. and G. STELLA, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1932 a. 29. 443.  
 —, *J. Cell. comp. Physiol.* 1932 b. 1. 113.  
 v. EULER, U. S., and G. LILJESTRAND, *Skand. Arch. Physiol.* 1937. 77. 191.  
 v. EULER, U. S., G. LILJESTRAND and Y. ZOTTERMAN, *Skand. Arch. Physiol.* 1939 a. 83. 132.  
 —, *Ups. Läkarför. Förhandl.* 1939 b. 45. 373.  
 —, *Acta physiol. scand.* 1941. 1. 383.  
 HEYMANS, C., and P. RIJLANT, *C. R. Soc. Biol. Paris* 1933. 113. 69.  
 PI SUÑER, A., and F. DOMENECH-ALSINA, *Ann. Physiol. Physicochim. biol.* 1938. 14. 617.  
 SAMAN, A., and G. STELLA, *J. Physiol.* 1935. 85. 7. P.  
 TOURNADE, A. and J. MALMÉJAC, *Bull. Acad. Méd. Belg.* 1930, Sér. 5. 10. 653.  
 ZOTTERMAN, Y., *Skand. Arch. Physiol.* 1935. 72. 73.

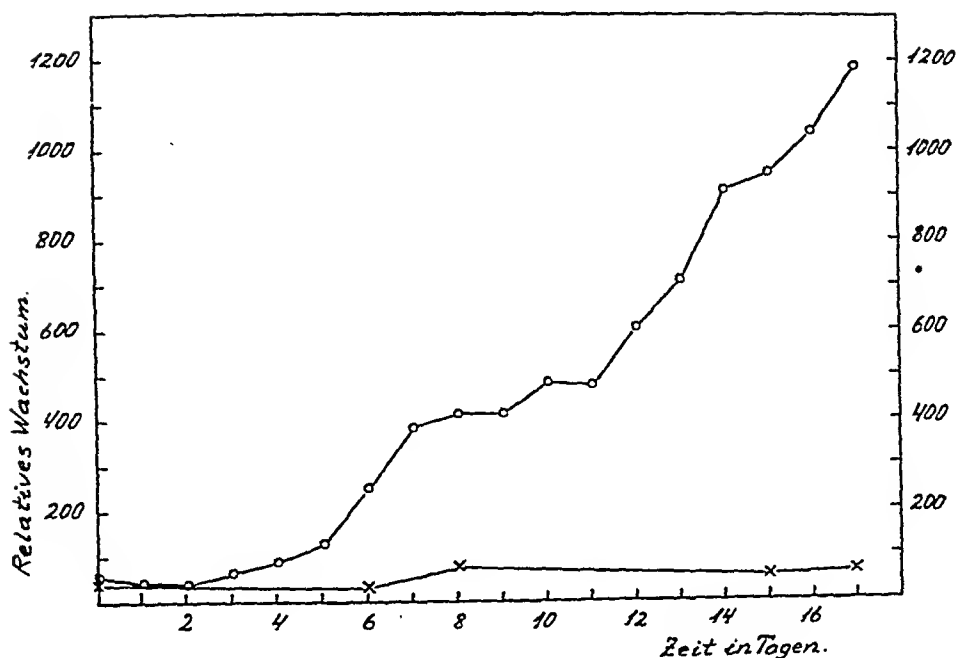


Abb. 8. Erklärung im Text.

nen, wiederholten wir die früheren Untersuchungen mit einer Aminosäuremischung in solchen Medien, die von Anfang an für die Zellen völlig insuffizient waren.

Folgende Versuche liefern den eindeutigen Beweis für die Ausnutzung reiner Aminosäuren durch die Zellen (2243). Sämtliche Bestandteile des Mediums, Heparinplasma, Embryonalextrakt und Serum, waren 8 Tage lang in der üblichen Weise gegen Glukose-Ringerlösung dialysiert worden. Den Versuchskulturen wurden, verteilt zwischen fester und flüssiger Phase, 0.2 ml der vollständigen BERGMANN-Aminosäuremischung wie oben angegeben, in einer Konzentration von 3.3 mg% A.-N im Medium zugesetzt. Sowohl in den Kontrollen wie in den Versuchskulturen wurde das Plasma mit 3 Tropfen dialysiertem Embryonalextrakt koaguliert, dann wurde 0.5 ml Dialyseserum zugegeben. Die flüssige Phase (Dialyseserum mit dialysiertem Embryonalextrakt, in den Versuchskulturen ausserdem Aminosäuren) wurde jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Die Kurven in Abb. 8 bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Die Kulturhälften mit den Aminosäuren wachsen sogar sehr kräftig, während die Kontrollen praktisch keinerlei Anzeichen von Wachstum darbieten (2249—50).

Die Abbildungen 9 und 10 sind Photographien der ungefärbten

Kulturen am 12. Tage des Versuchs. Die Kontrolle zeigt spärliche Auswanderung von Zellen, wie sie am 6.—7. Tag erschien, vermutlich unter Einfluss von Produkten der Autolyse im Gewebestück (s. Abb. 8). Die ausgewanderten Zellen gingen schnell wieder zugrunde und liessen nur Schatten zurück. Dagegen wuchsen die Versuchskulturen zu ansehnlicher Grösse aus. Die Photographien zeigen erst weniger als die Hälfte des Wuchses, den die Kulturen am 18. Tage aufwiesen, da sie in neue Flaschen mit dem gleichen dialysierten Medium und den Aminosäuren über-



Abb. 9. Kontrolle 2249, photographiert am 12. Tage des Versuchs ( $\times 25$ ).

tragen wurden. Hier wuchsen die Zellen nur teilweise wieder aus, aller Wahrscheinlichkeit nach deshalb, weil die Kulturen in einem recht späten Stadium überführt wurden, als viele der Zellen sich in schlechter Verfassung befanden. In einer Versuchsreihe von 8 Kulturen war das Ergebnis das gleiche. Abb. 11 und 12 zeigen ein Kulturpaar aus derselben Serie, am 8. Tage des Versuchs lebend photographiert. Die Kontrolle dagegen hat hier nicht bei einer einzigen Zelle Wachstum aufgewiesen (2251—52). In Abb. 13 u. 14 sieht man zwei stark vergrösserte Aufnahmen der Zellen aus zusammengehöriger Kontroll- und Versuchskultur (2245—46). Die Zellen der Kontrolle befinden sich in Auflösung, während die Versuchskultur noch Zellen mit vollständig glasklarem Protoplasma aufweist sowie andere, die mit grossen, groben Vaeuolen gefüllt sind. Auch aus diesem Versuch geht mit aller Deutlichkeit hervor, dass der Wuchsstoff die Lebensdauer der Zellen nicht verlängern, auch ihr Absterben nicht verhindern kann, wenn

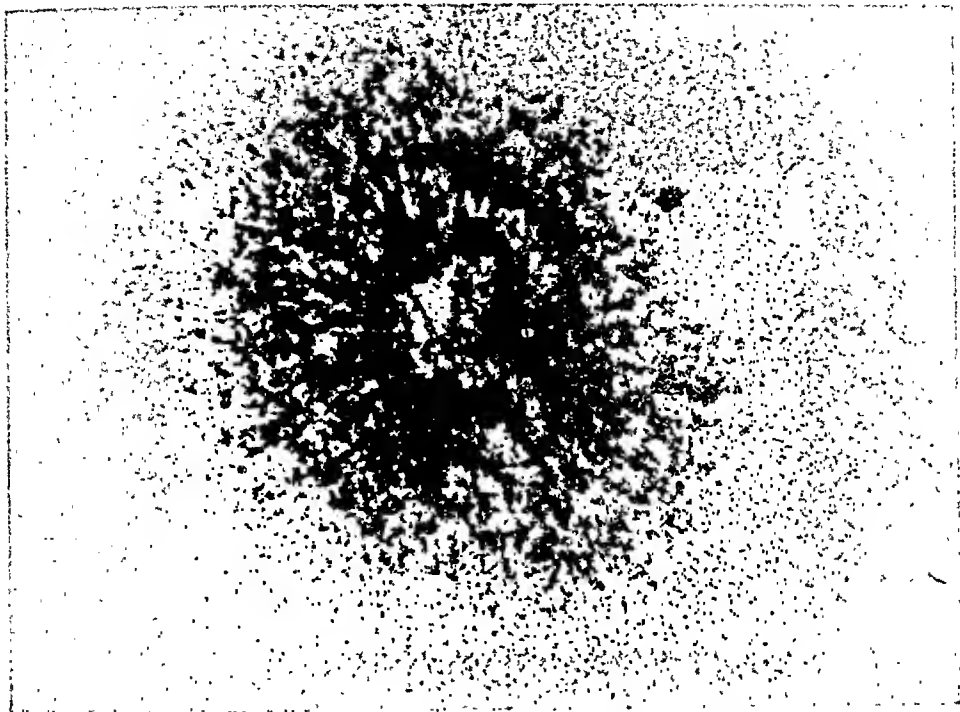


Abb. 10. Versuchskultur 2250, photographiert am 12. Tage d. Versuchs ( $\times 25$ ).

nicht zugleich der notwendige energieliefernde Brennstoff vorhanden ist, in diesem Fall Aminosäuren.

Wie vorher bereits gesagt, war Cystin alleine imstande, auf jeden Fall eine Zeitlang, den Mangelzustand in den Dialysekulturen aufzuheben. Bei einer erneuten Untersuchung, diesmal im gänzlich dialysierten Medium, bestätigte sich das nochmals. Ein Vergleich zwischen der Wirkung des Cystins einerseits und der vollständigen BERGMANNMischung andererseits ergibt einwandfrei, dass letztere weit vollständiger ist als das Cystin allein. Mit Cystin als einzigem komplettierendem Faktor wird zwar ein deutliches Wachsen der Kulturen mit Embryonalextrakt erreicht, aber es kommt bald zum Stillstand, und sie erreichen bei weitem nicht die Grösse wie mit der ganzen BERGMANNMischung (2269). Auf der andern Seite kann die BERGMANNMischung ohne Cystin (2266) nicht annähernd so viel leisten wie Cystin allein. ROSES Aminosäuremischung bleibt, wie schon gesagt, auch unter diesen Verhältnissen ohne Wirkung (2272). Eine lange Reihe von Versuchen wurde mit Cystin und Cystein, mit und ohne Wuchsstoff, ausgeführt (2313). Beide entfalten ungefähr die gleiche Wirksam-



Abb. 11. Kontrolle 2251, photographiert am 8. Tage d. Versuchs ( $\times 25$ ).

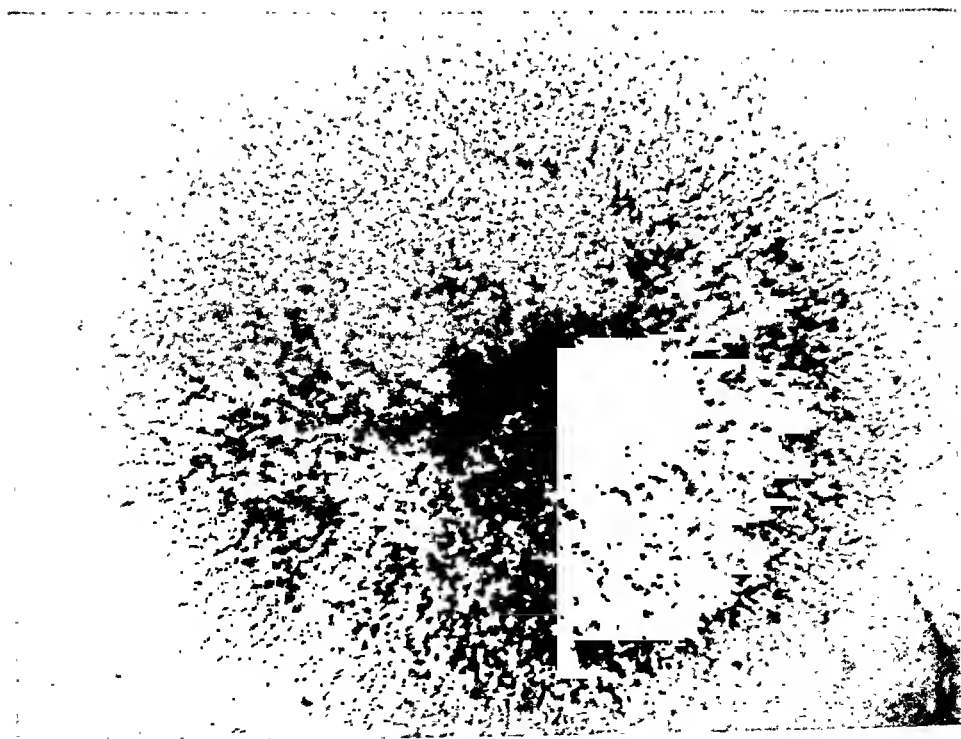


Abb. 12. Versuchskultur 2252, photographiert am 8. Tage d. Versuchs ( $\times 25$ ).



Abb. 13. Kontrolle 2245 ( $\times 142$ ).

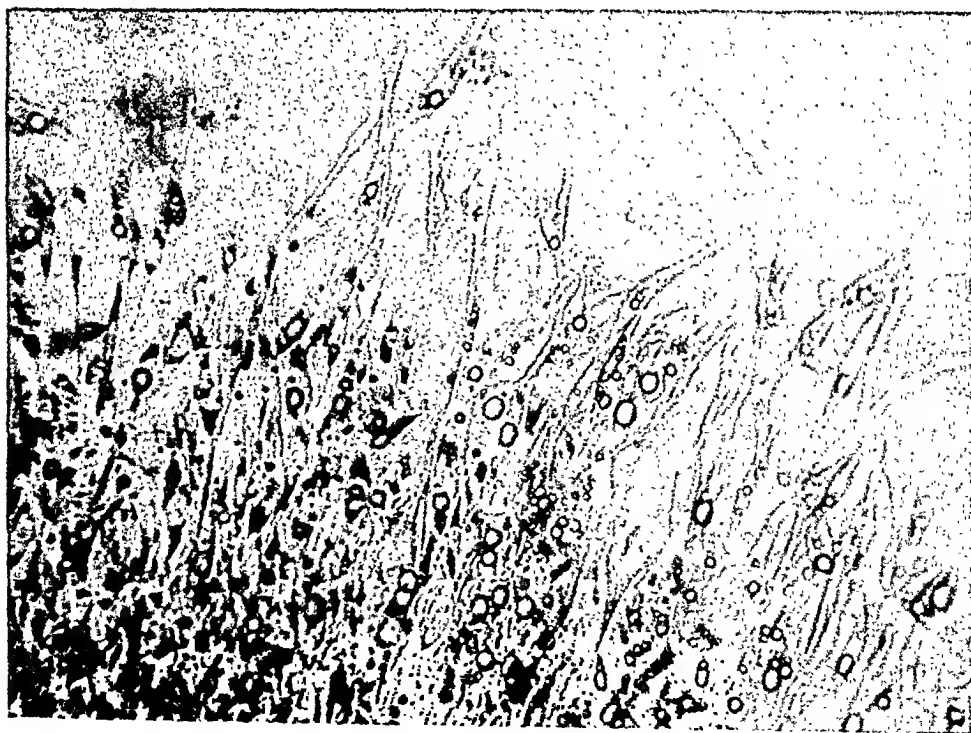


Abb. 14. Versuchskultur 2246 ( $\times 142$ ).

keit und üben nur teilweise Komplettierung aus, das Cystin vielleicht ein wenig schwächer. Nach Zusatz von Wuchsstoff ergab sich zwar einiges Wachstum — aber bei weitem nicht so viel wie mit BERGMANN'S Aminosäuremischung.

Aus der Überlegung heraus, ob es vielleicht das Sulfhydryl — bezw. die Disulfidgruppe — sein könnte, das den wirksamen Faktor im Cystin oder Cystein darstellt, untersuchten wir dann, ob denaturierte Proteine, die Nitroprussid-Reaktion ergaben, das Cystin oder Cystein ersetzen können. Kristallinisches Eialbumin wurde, nachdem das Ammoniumsulfat durch Dialyse entfernt war, 10—15 Minuten auf 70° C gehalten. Dann besass es eine ausgeprägte Wirkung, die in keiner Beziehung hinter der des Cystins zurückstand (2359). Wärmedenaturiertes Dialyseserum war gleichfalls sehr wirksam (2322; 2352). Auch hierauf war Wuchsstoff wirksam. Demnach scheint also den -SH und -SS- eine ausserordentlich grosse Bedeutung für die Erhaltung des Zellebens und -wachsens zuzukommen.

## 8.

### Antwortung.

Wenn es bisher nicht gelungen ist, die Bedeutung der Aminosäuren für das Leben und Weiterwachsen der Gewebszellen nachzuweisen, so hat das zweierlei Ursachen. Erstens berücksichtigte man die Tatsache nicht, dass die benutzten Nährböden von vornherein Aminosäuren enthielten, und zweitens ging man stets von der Annahme aus, dass ein Weiterwachsen in Form von Auswucherungen die Reaktion der Zellen auf die Teilnahme der Aminosäuren am Stoffwechsel sein müsse. Wenn nun immer wieder Versuche mit Aminosäuren auf Gewebszellen *in vitro* aufgenommen wurden, so ist damit die ungewöhnliche Bedeutung dieser Frage nachdrücklich unterstrichen. Die Gewebezüchtung ist tatsächlich die einzige gegenwärtig verfügbare Methode, mit der das Problem direkt gelöst werden kann.

Die bisher über Gewebekulturen veröffentlichten Untersuchungen haben bekanntlich zu der Anschauung geführt, dass Aminosäuren in stärkerer Konzentration toxisch wirken, während sie in geeigneten schwächeren nicht imstande sind, das Wachstum der Zellen anzuregen oder ihre Lebensdauer zu verlängern. In den Lehrbüchern der Physiologie wird oft auf Gewebekulturversuche hingewiesen. So wird z. B. angegeben, dass die dem

Organismus zugeführten Eiweissstoffe umgebildet werden müssen um zum Aufbau der Gewebe zu dienen, und dass ausserdem ein Umbau des Gewebeeiweisses vor sich gehe. Als Beispiel dafür wird die Gewebekultur genannt, weil sie auf Blutserum gezüchtet werden kann (vgl. NEUBAUER 1928). Man hat sich auf Gewebekulturversuche berufen zur Stütze der Auffassung, wonach die Gewebszellen selber die Proteine des Blutes, die ihnen als geeignete Nährstoffe dienen, abbauen. Eine derartige Auffassung haben wir selber vertreten, FISCHER (1937). Wie noch weiter unten erörtert werden soll, kann man schwerlich um die Annahme herum kommen, dass die Gewebszellen auch imstande sind, gewisse Proteine des Blutes als N-Quelle auszunutzen. In den Lehrbüchern wird nun weiter angegeben, dass, solange nicht der Beweis dafür vorliegt, dass die resorbierten Aminosäuren den Organen durch die Blutbahnen zugeführt werden, doch noch die Möglichkeit offen bleibt, dass ein Teil der vom Darm aufgenommenen Bausteine andre Wege einschlägt. Ein solcher Beweis lässt sich nur dann erbringen, wenn festgestellt werden kann, dass eine quantitative Aufnahme der resorbierten Aminosäuren in den Organismus erfolgt. Sonst aber wäre es doch denkbar, dass die alte Hypothese von der Resynthese des Eiweissstoffes wieder hervorgeholt werden muss und damit die Auffassung, dass die Blutproteinstoffe den Geweben als Nährstoffe dienen.

Die von CARREL und seinen Mitarbeitern ausgegangene lange Reihe bedeutsamer Arbeiten lässt klar erkennen, dass man in der Hauptsache darauf vorbereitet war, proliferierendes Wachsen als Reaktion auf die Ausnutzung der Aminosäuren durch die Zellen zu sehen. Die genannten Autoren haben sich wohl mehrere Male der Dialyse bedient, aber bezeichnenderweise nur der des Embryonalextraktes, BAKER und CARREL (1926). Die wachstumsfördernde Wirkung des dialysierten Extraktes wurde herabgesetzt im Vergleich mit der des nicht dialysierten. Auf der andern Seite war das Ultrafiltrat des Extraktes wirkungslos, und ein Zusatz der Mischung aus 16 Aminosäuren zum dialysierten Extrakt machte die Sache auch nicht besser. E. MAYER und A. FISCHER (1937) führten eine Reihe Versuche aus, um zu erfahren, ob Aminosäuren überhaupt imstande seien, die Lebensdauer der Gewebszellen zu verlängern, nachdem das Züchtungsmedium von Zeit zu Zeit mit physiol. Salzlösung gewaschen und dann mit Aminosäuren versetzt worden war. Dabei zeigte sich jedoch, dass sowohl die Kulturen mit wie auch die ohne Aminosäuren gleich-



zeitig zugrunde gingen. Die Ursache hierfür kennen wir erst jetzt, da wir wissen, dass die Zellen es nicht vertragen, längere Zeit hindurch proteinfreien Salzlösungen ausgesetzt zu werden.

Dass es nunmehr geglückt ist, die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebszellen nachzuweisen, verdanken wir ausschliesslich der Tatsache, dass das Züchtungsmedium zunächst von seinen natürlichen Aminosäuren durch Dialyse befreit wurde. BAKER (1939) machte einige Beobachtungen über die Bedeutung des Serums, vermochte jedoch nicht, die richtigen Schlüsse daraus zu ziehen. Das Wachsen der Bindegewebszellen hört auf in den Flaschen, bei denen Serum allmählich ausgewaschen wird, wenn jeden zweiten Tag neue »Nahrung« nur in Form von Embryonal-extrakt zugesetzt wird. Ersetzt man dagegen das ausgewaschene Serum wieder, so geht das Wachstum weiter und die Kulturen erreichen ansehnliche Grössen. Daraus schloss BAKER, dass das Serum wichtige Nährstoffe enthalten könne, die entweder garnicht oder doch nur in geringer Menge im embryonalen Gewebsextrakt vorkommen. Die Aminosäuren kamen der genannten Verfasserin nicht einen Augenblick in den Sinn.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass jegliches Wachstum aufhört, wenn die Zellen in ein dialysiertes Medium gebracht werden, und dass sie durch Autolyse schnell zugrunde gehen. Die Zellen bieten alle Anzeichen eines Hungerzustandes dar, selbst wenn Zucker und die erforderlichen Salze vorhanden sind. Durch diese Tatsache und die weitere, dass ein teilweise mit Trypsin verdautes Dialyseserum als Zusatz zum Medium jenen Mangelzustand aufzuheben vermag, wird es offensichtlich, dass die Zellen nicht imstande sind, den Abbau des Proteinstoffes im Medium vorzunehmen.

Auch die nach Säurehydrolyse ganz abgebauten Proteinstoffe sind befähigt, die Lebensdauer der Zellen in den sonst insuffizienten Medien zu verlängern. Während die mit Trypsin verdauten Proteinstoffe ausserdem wachstumsfördernd auf die Zellen einwirken können, scheint ein Gleiches bei den Aminosäuren nicht der Fall zu sein. Das ist eine Beobachtung, die mit den von BAKER und CARREL (1928) gemachten völlig übereinstimmt.

Zu wiederholten Malen konnten wir folgendes beobachten: Kulturen in einem gänzlich insuffizienten Züchtungsmedium können plötzlich anfangen zu wachsen, nachdem sie längere Zeit hindurch keinerlei Anzeichen dafür aufgewiesen hatten. Ein

solcher Wachstumsausbruch steht nun immer in Zusammenhang mit einer plötzlich eintretenden teilweisen Autolyse von Gewebe und danach folgenden Verdauung des Plasmakoagulums. Dabei entstehen ausreichende Mengen von Abbauprodukten, die von andern, noch lebenden Zellen in der Nähe ausgenutzt werden können. Das ist eine Erscheinung, die bekannten Vorgängen physiologischer Art zur Seite gestellt werden kann, bei denen gewisse Organe auf Kosten anderer wachsen können, so z. B. der Muskelschwund beim Lachs zur Zeit der Eireife. Bisweilen konnten wir beobachten, wie Kulturen, die auf einer Mischung reiner Aminosäuren leben und langsam wachsen, plötzliche Sprünge im Wachstum ausführten. Jedesmal haben wir dann den Eindruck gehabt, dass ein plötzlicher Zerfall von Zellen vor sich ging, und dass die damit verbundene Autolyse zur Bildung gewisser Abbauprodukte geführt hatte, die von den Zellen für sich verwertet wurden. Solche Beobachtungen liessen bei uns den Gedanken auftauchen, dass gewisse Aminosäuren vielleicht indirekt Wachstum veranlassen können, indem sie das Absterben anderer Zellen fördern. Eine derartige Wirkung wurde von N. NIELSEN und J. DAGYS (1940) dem  $\beta$ Alanin, das ja als Wuchsstoff für Hefe dient, zugeschrieben. Auch wir fanden, dass diese Säure mit Cystin zusammen grössere Wirkung hatte als das Cystin alleine.  $\beta$ Alanin allein hat dagegen keine Wirkung auf die Zellen. Es ist gewiss, dass eine derartige endogene Aminosäurebildung einen physiologischen Vorgang von grosser Bedeutung darstellt.

Der tierische Wuchsstoff, wie er sich in Extrakten aus stark wachsenden Geweben findet, übt in dialysiertem Zustand keinerlei Wirkung auf die Gewebszellen im insuffizienten Medium aus. Dadurch unterscheidet er sich u. a. von den wachstumfördernden Abbauprodukten der Proteine vom Albumosecharakter (Proteosen). Der Wuchsstoff muss, wie wir lange vermutet und z. T. schon gezeigt haben, ein Katalysatorstoff, nicht aber ein energieliefernder Stoff im gewöhnlichen Sinne sein (FISCHER, 1930). Einige Forscher, darunter WRIGHT (1926), glaubten nachgewiesen zu haben, dass die wachstumfördernde Komponente im Gewebsextrakt dialysierbar sei. Das ist durchaus unrichtig. Selbst nach sehr lange dauernden Dialysen mehrerer Wuchsstoffe konnten wir keinen Verlust an Aktivität feststellen. CARREL und BAKER geben an, dass Embryonalextrakt nach Dialyse stark an Wirkung eingebüsst habe. Hierzu muss jedoch gesagt werden, dass ihre

Dialyse gegen destilliertes Wasser ausgeführt wurde, und das bewirkt natürlich schwere Ausfällungen an denaturiertem Protein.

Wir haben gesehen, dass Dialysat und Ultrafiltrat von Serum imstande sind, den Mangelzustand der Zellen, wenn auch nicht vollständig, aufzuheben, wenn dialysiertes Züchtungsmedium zugesetzt wird. Das Gleiche kann erzielt werden durch abgebaute oder der Säurehydrolyse unterzogene Proteinstoffe. Die beste Wirkung erreichten wir mit den Fraktionen, in denen die in Wasser schwerlöslichen Aminosäuren enthalten waren.

Eine einzige der von uns durchprobten Aminosäuren unterscheidet sich von den übrigen, nämlich das Cystin und z. T. auch das Cystein. Sie sind beide fähig, den Untergang der Zellen im unvollständigen Medium zu verzögern. Die beste komplettierende Wirkung des insuffizienten Mediums erzielten wir mit der von uns als BERGMANNMischung bezeichneten Zusammensetzung von 9 Aminosäuren, die von BERGMANN und NIEMANN (1936) quantitativ aus hydrolysiertem Fibrin isoliert wurden. Statt gleicher Gewichtsmengen wählten wir die relativen Konzentrationen, in denen diese Säuren im Fibrin vorhanden sind, und erreichten dadurch weit grössere Wirkung. Diese überraschende Feststellung lenkte unsere Aufmerksamkeit unwillkürlich auf die Frage nach der optimalen Konzentration für die Wirkung der einzelnen Aminosäuren. Soweit uns bekannt ist, weiss man noch nicht viel über die Mengenverhältnisse der einzelnen Aminosäuren im Blut. Im Schrifttum hat man auf die überraschende Beständigkeit hingewiesen, mit der sich sämtliche Konzentrationen von Aminosäuren im Blute bei derselben Tierart während des Fastens erhalten. ABDERHALDEN nimmt an, dass Leber und Darmwand für diese Regulierung eine Bedeutung haben (zit. nach Hdb. d. norm. u. patholog. Physiologie, Bd. 5). Wenn man von einem Aminosäurespiegel sprechen darf, der ebenso wie im Falle des Blutzuckers hier für die einzelnen Säuren gelten soll, so wäre es nicht weiter merkwürdig, dass das genannte Konzentrationsverhältnis in unserer Mischung einen Teil der Verantwortung für die erreichte gute Wirkung übernimmt. Es wäre ja garnicht so undenkbar, dass die Zusammensetzung des Fibrins hinsichtlich der Aminosäuren derjenigen des Protoplasmas ausserordentlich ähnlich ist und vielleicht einen Ausdruck dafür darstellt, dass eine parenterale Verdauung des Fibrins vor sich geht, BERGMANN u. NIEMANN (1937). Die Aminosäuren des Blutes stammen wohl kaum aus-

schliesslich von der Nahrungsaufnahme durch den Darm, namentlich nicht in einer Fastenperiode, wo ein grosser Teil der Gewebs- und Blutproteine abgebaut wird. Im Zusammenhang hiermit untersuchten wir, ob die Wirkung einer Mischung sich ändert, wenn die Konzentration einer der in ihr vorhandenen Säuren erhöht wurde. Wir fanden, dass das nicht der Fall war.

Das Cystin in der BERGMANNMischung spielt eine grosse Rolle. Ist es nicht darin vorhanden, so ist der übrige Teil der Säuren wirkungslos. Das ist jedoch nicht so aufzufassen, als ob dieser übrige Teil der Mischung überflüssig wäre. Benutzen wir von Anfang an das Verfahren mit den gänzlich dialysierten Medien, so ergibt sich eine begrenzte Wirkung des Cystins, während mit der Gesamtmischung langanhaltende Wirkung und Wachstum zustande kommt, falls noch dialysierter Embryonalextrakt zugesetzt wird. Die BERGMANNMischung bildet eine vollständigere Ernährung für die Zellen als das Cystin allein, das nach diesen Versuchen mit Bestimmtheit als unentbehrliche Aminosäure für die betreffenden Zellen anzusehen ist. Nach den Untersuchungen ROSES ist sie das nicht für den tierischen Organismus. Hier ist das Methionin eine unentbehrliche Säure, und der Organismus kann aus ihm selber das erforderliche Cystin bilden. Dagegen sind die isolierten Zellen, wie wir sie bei unseren Untersuchungen benutzten, nicht imstande, das Methionin zu entmethylieren.

ROSE (1938) als erstem ist es gelungen, Tiere bei einer Ernährung aus synthetischen Aminosäuren am Leben zu halten und wachsen zu lassen. Das führte zur Entdeckung einer neuen Aminosäure, des Threonin. ROSES Aminosäuremischung hatte keinerlei Wirkung auf die Zellen, und die Tatsache, dass ein Zusatz von Cystin auch nichts daran änderte, lässt darauf schliessen, dass Verunreinigungen in den Aminosäuren dafür verantwortlich zu machen sind. Einige Anzeichen deuten darauf hin, dass das Threonin die Schuld daran trägt. Bisweilen enthalten die synthetischen Aminosäuren Spuren von Verunreinigungen, die toxisch wirken können. ABDERHALDEN (persönliche Mitteilung) hat die Erfahrung gemacht, dass die bei solchen Untersuchungen beobachteten toxischen Wirkungen meistens durch Verunreinigungen veranlasst sind.

Es hat sich indessen bei unseren Untersuchungen gezeigt, dass das Cystin eine Sonderstellung einnimmt insofern, als die komplettierende Wirkung der untersuchten Mischung eng mit seiner Anwesenheit zusammenhängt. Demnach scheint das

Cystin eine Art Schlüsselstellung einzunehmen, und diese darf mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Schwefelgruppe zurückgeführt werden. Schwefelhaltige Proteinstoffe haben, wenn die Schwefelgruppe durch Denaturierung freigelegt wird, eine ähnliche Wirkung wie das Cystin und können an dessen Stelle treten. In dieser Weise ist Eialbumin, Serumalbumin, Insulin und eine schwache Lösung von  $\text{Na}_2\text{S}$  wirksam. Alle Anzeichen sprechen dafür, dass das Disulfid — bzw. die Thiolgruppe — der wirksame Faktor beim Cystin oder Cystein und denaturiertem Protein ist. Die Frage, ob die Aminosäuren, die wir den Gewebszellen gegenüber als wirksam erkannt haben, als solche in das Zellprotoplasma eingebaut werden, oder ob sie als energielieferendes Material dienen und entaminiert werden, lässt sich noch nicht entscheiden. Die zuckersparende Wirkung der Aminosäuren ist jedenfalls unter den Versuchsbedingungen sehr gering. In zuckerfreiem Züchtungsmedium hielten die Zellen sich etwas länger mit Aminosäuremischung als ohne diese. Die Wirkungen der Aminosäuren auf die Zellen könnte eher so gedeutet werden, dass einige beim Aufbau wichtiger enzymatischer Teile in den Zellen dienen, wie sie für gewisse Abbauvorgänge oder sogar Synthesen notwendig sind. Diese Fragen wären vielleicht zu lösen, wenn die Wirkung der den Aminosäuren entsprechenden Oxy- und  $\alpha$ -Ketosäuren untersucht wird.

Viele Zeichen lassen darauf schliessen, dass das Cystin eine andere Bedeutung hat als die, für mangelhafte Ernährung Ausgleich zu schaffen. Erinnern wir uns hier der vielen enzymatischen Systeme, die durch die Thiolgruppen aktiviert werden. Das nächstliegende wäre aber wohl, an die proteolytischen Systeme zu denken. Gerade diesen gegenüber wirken Glutathion und andere Thiolverbindungen wie eine Steuervorrichtung durch ihre Einstellung auf bestimmte Redoxpotentiale und vielleicht auch zugleich noch durch Bindung von Spuren schwerer Metalle an die -SH. Auf jeden Fall steht ganz unumstösslich fest, dass gewisse proteolytische Enzyme durch -SH aktiviert werden (GRASSMANN, 1930; KARRER, 1933; v. EULER, 1934; CSONKA, 1938, u. a. m.). Vielerlei deutet darauf, dass es die gebundenen -SHgruppen im Protein des Enzyms sind, die diesen reversiblen Oxydations- und Reduktionsvorgängen unterliegen. Man nimmt ja in Wirklichkeit an, dass das aktive Enzym eine Thiolverbindung, die inaktive Form dagegen eine Disulfidverbindung ist.

Noch können wir nichts mit Sicherheit darüber aussagen, warum das Cystin diese ausgezeichnete komplettierende Wirkung auf die Zellen in unserem insuffizienten Medium ausübt. Am nächstliegenden ist die Annahme, dass die Disulfidgruppe aktivierend auf ein proteolytisches System einwirkt, das es den Zellen möglich macht, das Protein im umgebenden Medium abzubauen oder etwa eine Synthese von Zellsubstanz mit den übrigen Aminosäuren der benutzten Mischung einzugehen. Diese Annahme findet eine Stütze in dem Umstand, dass das Cystin allein nicht imstande ist, eine so vollständige Wirkung zu entfalten, als wenn es in Verbindung mit einer Anzahl anderer Aminosäuren auftritt, die für sich selber wieder keine Wirkung besitzen. Man kann also annehmen, dass das Cystin entweder direkt als Aktivator auf Zellproteasen einwirkt (z. B. Kathepsin), oder indirekt durch Schaffung des geeigneten Redoxpotentials für die Aktivität dieser Vorgänge.

HOPKINS (1925) hat nachgewiesen, dass -SHgruppen Fettsäuren bei einem pH von 3.5—4.0 und Protein bei pH 7.4—7.6 oxydieren. Nach BORSOOK, DAVENPORT (1937) und anderen bilden ferner Thiolverbindungen, Glukose, Dehydrogenase, Haemochromogen, Ascorbinsäure und Sauerstoff ein geschlossenes respiratorisches System. In welcher Weise das Cystin in den Stoffwechsel der Zellen bei unseren Untersuchungen eingriff, lässt sich noch nicht mit Sicherheit klarlegen. Unter den vielen Möglichkeiten halten wir die Aktivierung eines proteolytischen Systems in den Zellen für die wahrscheinlichste. Wenn denaturiertes Eialbumin, Serumalbumin und Insulin bei unseren Versuchen die Rolle des Cystins zu übernehmen vermochten, so spricht das eher dafür, dass das Cystin ein Aktivator ist und nicht als gewöhnlicher Baustein dient, und dass der wirksame Teil des Moleküls durch die Schwefelgruppe vertreten ist. Man weiss, dass das Papain durch denaturiertes Eialbumin aktiviert werden kann, das als Thiol-Aktivator wirkt, BERSIN (1940).

Cystin ist eine Disulfidverbindung, die zusammen mit dem Sulfhydryl der Zellen das dynamische Gleichgewicht festlegt:  $-SS- \rightleftharpoons -SH$ . HOPKINS und ELLIOT (1932) geben an, dass in einem Organ mit intakter Blutzirkulation Glutathion in oxydierter Form im Gleichgewicht mit der reduzierten Form vorhanden ist. In einem herausgenommenen Organ wird das ganze Glutathion reduziert, selbst wenn die Zellen nur ganz kurze Zeit einem Sauer-

stoffmangel ausgesetzt waren. Das könnte dafür sprechen, dass das Cystin schnell reduziert wird, wenn man es den Kulturen zusetzt.

RAPKINE (1938) hat an Seeigeleiern nachgewiesen, dass eine Denaturierung des Proteins in den Zellen ihrer Teilung vorausgeht, und dass dabei -SHgruppen freigelegt werden. Dass dieser Vorgang von allergrösster Wichtigkeit für die folgende Entwicklung ist, wird weiterhin aus den bedeutsamen Arbeiten BRACHETS (1938) ersichtlich. Dieser untersuchte die Lokalisation von Stoffen mit freien -SHgruppen während der frühen Embryonalentwicklung von Amphibienlarven von dem Augenblick an, da das Ei befruchtet wurde. Beachtenswert ist es nun dabei, dass die Lokalisation von -SH genau mit den Gebieten zusammenfällt, die vom morphogenetischen Standpunkt aus die grösste Bedeutung haben, nämlich den Gebieten mit besonders aktivem Stoffwechsel.

EPHRUSSI (1932) wies nach, dass Gewebekulturen, die sich in lebhaftem Wachsen befinden, starke Nitroprussidreaktion ergeben. Klingt das Wachsen ab, so wird auch die Reaktion schwächer oder ganz negativ. Sowohl RAPKINE wie auch EPHRUSSI schreiben der -SHgruppe sehr grosse Bedeutung als Wachstumsaktivator zu; sie sind der Meinung, dass diese Gruppen für die wachstumsfördernde Wirkung des Embryonalextraktes verantwortlich sind. Embryonalextrakt ist besonders reich an -SH.

Man hat auch die Wirkung des Glutathion auf das Wachsen der Gewebszellen untersucht. So fanden HUEPER und RUSSEL (1933), dass embryonaler Gewebsextrakt 40 mg% Glutathion, als -SH gemessen, enthält. Cystein als Zusatz zu den Kulturen in einer Menge, wie sie dem Gehalt des Extraktes an Sulfhydryl entsprach, hatte stimulierenden Einfluss, doch war er nicht gross genug, um eine Erklärung für die Wirkung des Embryonalextraktes zu bieten. VERNE (1938) und andere sind der Meinung, dass Glutathion ein notwendiger Faktor sei, doch nicht ausreichend als Ersatz für die embryonalen Gewebssäfte.

Diese wenigen Hinweise auf die Bedeutung der Thiolverbindungen für den intermediären Stoffwechsel der Zellen lassen noch starker die Sonderstellung des Cystins unter den von uns untersuchten Aminosäuren hervortreten.

Frühzeitig war man sich klar darüber, dass die Gewebekulturtechnik die geeignetste Methode zur Lösung physiologischer Fragen dieser Art bieten müsse. Denn es wird kaum mit irgendeiner andern heute bekannten Technik möglich sein, so durch-

sichtige Versuchsbedingungen zu erzielen. Ein Weiterkommen mit solchen Versuchen war fast stets gehemmt, weil es an Methoden fehlte, um die einzelnen Komponenten der Nährstoffe quantitativ restlos zu entfernen. Wenn es hier jetzt geglückt ist, derartige Untersuchungen durchzuführen, so ist das in erster Reihe dem Verfahren zu verdanken, nach dem man quantitativ eine ganze Reihe von Stoffen, die für das Leben der Zellen von grundlegender Bedeutung sind, entfernt. Bei systematischem Durchsuchen kann somit die Bedeutung der entfernten Stoffe, seien sie bekannt oder unbekannt, festgestellt werden, indem man sie einzeln wieder hinzusetzt. Sodann verfügen wir mit dieser Technik über die Möglichkeit, die besonderen Ansprüche der einzelnen Gewebszellen aufzudecken. Auf diese Weise wird es sicherlich gelingen, die Gewebszellen so zu klassifizieren, wie man es sich früher schwerlich vorgestellt hat. Da musste man sich mit einer rein morphologischen Einteilung der Zelltypen begnügen, wie die klassische Zellehre und die Schnitthistologie es uns gelehrt hat. Welche Bedeutung vom physiologischen Gesichtspunkt hat es doch z. B., dass wir den Nahrungsbedarf der verschiedenartigen Gewebszellen zu registrieren vermögen! Wie schon erwähnt, haben wir erst einige Untersuchungen rein orientierender Art angestellt, aber sie zeigen doch schon, dass nur wenige Gewebszellentypen die Fähigkeit besitzen, auf den dialysierten Medien zu leben, nämlich diejenigen, die Protein abbauen können (Darmepithel, Chorion, z. T. auch Sarkomzellen). Auch hierdurch wird gewiss einmal Gelegenheit geboten werden, unsere Kenntnis von der Physiologie der malignen Gewebszellen zu erweitern. Namentlich wird es Bedeutung haben, vergleichende Untersuchungen über maligne und die ihnen entsprechenden gesunden Gewebszellen innerhalb derselben Tierart auszuführen.

### Zusammenfassung.

1. Es wird ein Verfahren angegeben, mit dem alle dialysierbaren Stoffe aus dem Züchtungsmedium für Gewebszellen entfernt werden können.

2. Ein dialysiertes Züchtungsmedium ist insuffizient für die benutzten Gewebszellen (osteogene Fibroblasten). In solchem Medium verfallen die Zellen schnell der Autolyse.

3. Die Vervollständigung des Mediums erfolgt, wenn normales Serum oder dessen Dialysat oder Ultrafiltrat zugesetzt wird.



4. Periostale Fibroblasten sind nicht imstande, dialysierte Plasmaproteine abzubauen.

5. Trypsinverdaute oder der Säurehydrolyse unterzogene Proteine (vorher dialysierte) wirken, dem insuffizienten Medium zugesetzt, komplettierend. Die wirksamsten Fraktionen fanden sich unter den in Wasser schwerlöslichen Aminosäuren.

6. Es wird zum ersten Male direkt nachgewiesen, dass Aminosäuren von Gewebszellen ausgenutzt werden. Eine Mischung von 9 Aminosäuren, wie BERGMANN und NIEMANN sie quantitativ aus dem Fibrin isoliert haben, wirkte völlig komplettierend auf das Wachsen der Zellen in einem dialysierten Medium. Stand die relative Konzentration der einzelnen Aminosäuren in der Mischung in demselben Verhältnis, in der diese Säuren im Fibrin vorkommen, so war die Wirkung gross. Enthielt die Mischung dagegen nur gleiche Gewichtsteile, so besass sie praktisch keine Wirkung. Dieses eigenartige Verhältnis wird eingehender erörtert.

7. Die von ROSE benutzte Aminosäuremischung, mit der er Wachstum bei jungen Tieren erreichen konnte, war wirkungslos.

8. Methionin kann von den benutzten Gewebszellen nicht ausgenutzt werden, wohl aber Cystin.

9. Cystin nimmt eine Sonderstellung unter den gebrauchten Aminosäuren ein, indem es für sich allein eine Zeitlang imstande ist, die Zellen vor dem Untergang im insuffizienten Medium zu schützen. Die untersuchten Aminosäuremischungen sind ohne Cystin wirkungslos.

10. Denaturiertes Eialbumin, Serumalbumin und Insulin haben dieselbe Wirkung wie Cystin.

11. Es wird vermutet, dass Cystin ebenso wie die denaturierten Proteine durch den Gehalt an -SS- und -SH wirken, möglicherweise auch als Aktivator für ein proteolytisches System, das dadurch den Zellen einen Abbau der vorhandenen Proteine ermöglicht.

12. Orientierende Untersuchungen haben gezeigt, dass nur bestimmte Zellen auf den dialysierten Medien zu leben vermögen, u. zw. weil sie über ein aktives proteolytisches System verfügen. Dazu gehören Darmepithel, Chorionzellen und z. T. Sarkomzellen aus Rous's Sarkom.

13. Einige Verhältnisse hinsichtlich der Bedeutung von Zucker und Eiweiss werden untersucht. Eine Aminosäuremischung kann das Zugrundegehen der Zellen in zuckerfreiem Züchtungsmedium um einiges verzögern. Wird das Protein ganz oder teilweise durch

physiologische Salzlösung (Ringer oder Tyrode) ersetzt, so gehen die Zellen infolge der Störung im DONNANGleichgewicht recht schnell zugrunde.

14. Es wird gezeigt, dass der tierische Wuchsstoff (in den embryonalen Gewebsextrakten) nur dann wirksam ist, wenn die ergänzenden Aminosäuren zugegen sind. Der Wuchsstoff wirkt nicht energieliefernd sondern katalysierend.

### Literaturverzeichnis.

- ASTRUP, T. *Enzymologia*, 1938, 5, 12.  
 BAKER, L. E. *J. Exp. Med.*, 1933, 57, 689.  
 BAKER, L. E. *Ebenda*, 1939, 69, 625.  
 BAKER, L. E., and A. CARREL. *Ebenda*, 1926, 54, 397.  
 BAKER, L. E., and A. CARREL. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1926, 95, 260.  
 BAKER, L. E., and A. CARREL. *J. Exp. Med.*, 1928, 47, 353.  
 BAKER, L. E., and A. CARREL. *Ebenda*, 1928, 48, 533.  
 BAKER, L. E., and A. H. EBELING. *Ebenda*, 1939, 69, 365.  
 BERGMANN, M., and C. NIEMANN. *J. Biol. Chem.*, 1936, 115, 77.  
 BERGMANN, M., and C. NIEMANN. *Science*, 1937, 86, 187.  
 BERSIN, TH. *Hdb. der Enzymologie*. 1940, 1, 579.  
 BORSOOK, H., H. W. DAVENPORT, C. E. P. JEFFREYS, and R. C. WARNER. *Journ. Biol. Chem.*, 1937, 117, 237.  
 BRACHET, J. *Bull. Sci. Acad. roy. Belg.*, 1938, 24, 499.  
 BURROWS, M. T., and C. A. NEYMANN. *J. Exp. Med.*, 1917, 25, 93.  
 CARREL, A., and A. H. EBELING. *Ebenda*, 1922, 36, 645.  
 CARREL, A., and A. H. EBELING. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1924, 50, 31.  
 CSONKA, F. A. *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, 1938, 38, 281.  
 DOLSCHANSKY, L. *Z. Zellforsch.*, 1929, 8, 789.  
 EPHRUSSI, B. *La culture des tissus*, Paris 1932.  
 EULER, H., P. KARRER und F. ZEHENDER. *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, 157.  
 FISCHER, A. *Gewebezüchtung*, München, 1930.  
 FISCHER, A. *Virchows Arch.* 1930, 279, 94.  
 FISCHER, A. *Arch. exp. Zellforsch.*, 1937, 19, 255.  
 FISCHER, A., and A. C. PARKER. *Ebenda*, 1929, 8, 297.  
 GRASSMANN, W., H. DYCKERHOFF und O. v. SCHOENEBECK. *Hoppe-Seyl. Z.*, 1930, 186, 183.  
 HOPKINS, F. G. *Biochem. J.* 1925, 19, 787.  
 HOPKINS, F. G., and K. ELLIOTT. *Proc. Roy. Soc., London, B*, 1932, 109, 58.  
 KARRER, P., and F. ZEHENDER. *Helv. Chim. Acta*, 1933, 16, 701.  
 MAYER, E., and A. FISCHER. *Skand. Arch. Physiol.*, 1937, 75, 268.  
 NEUBAUER, O. *Handb. d. norm. u. pathol. Physiol.*, Berlin 1928, 5, 737.  
 NIELSEN, N., og J. DAGYS. *C. R. Lab. Carlsberg, Ser. physiol.*, 1940, 22, 447.

- RAPKINE, L. *Biochem. J.* 1938, *32*, 1729.  
ROSE, W. C. *Physiol. Rev.* 1938, *18*, 109.  
SHIBATA, T. *Arch. exp. Zellforsch.*, 1929, *8*, 142.  
VERNE, J., et A. VERNE-SOUBIRAN. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1938, *127*,  
1090.  
WRIGHT, G. P. *J. Exp. Med.*, 1926, *43*, 591.
-

From the Physiological Institute of the University of Oslo.

## Titrimetric Determination of the Carbon Dioxide Content of Biological Fluids.<sup>1</sup>

By

R. WENNESLAND.

---

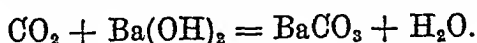
In a previous paper (WENNESLAND 1940) I have described a new method for the determination of carbon monoxide in blood. The blood is brought into an Erlenmeyer flask, mixed with water, and the carbon monoxide is liberated by adding dilute sulfuric acid. The gas wanders by its own kinetic power into another Erlenmeyer flask connected with the first one by an airtight rubber cuff, and containing a known solution of palladium chloride. A corresponding quantity of the latter is reduced to metallic palladium, and the excess of palladium chloride is determined iodometrically.

The principle of this method can be applied for the determination of other gases or volatile substances of biological fluids.

In the following paper I will describe its application to carbon dioxide determinations.

### Principle.

The fluid under examination, e. g. plasma, is brought into an Erlenmeyer flask, and made strongly acid by a non-volatile acid, e. g. sulfuric acid. Another Erlenmeyer flask containing a known solution of barium hydroxide, is connected with the first one by an airtight rubber cuff. The carbon dioxide liberated reacts with the barium hydroxide after the following equation:



---

<sup>1</sup> Received 8. April 1941.

The  $\text{BaCO}_3$  is precipitated, and the excess of  $\text{Ba(OH)}_2$  is determined by titration with hydrochloric acid. Blanks are made in the same way with all reagents except the plasma, to correct for the contents of carbon dioxide in the air and in the reagents.

### Reagents.

10 per cent sulfuric acid.

1/25 N barium hydroxide solution (approximate). 3.43 grams of  $\text{Ba(OH)}_2$  p. a. (MERCK) are dissolved in 1 liter of distilled water, and stored in a stoppered bottle. Before each day's use a sufficient portion of the reagent is filtered through a white ribbon filter paper (Schleicher & Schüll No. 589<sup>2</sup>).

1/50 N hydrochloric acid is prepared by diluting concentrated HCl p. a. of known specific gravity with distilled water. It is adjusted against 1/20 N standard sodium carbonate solution with methyl orange indicator, following KOLTHOFF's directions (KOLTHOFF 1931).

Indicator: For the final titration of the excessive  $\text{Ba(OH)}_2$  I tried several indicators after KOLTHOFF. None of them were quite satisfactory. I prepared at last a good indicator by mixing equal portions of 1 per mille solutions in 50 per cent alcohol of phenolphthalein, thymol blue and methyl green. The indicator changes its colour from violet—blue—steel grey—to a brilliant yellow green at a pH of about 9—8. The change of colour from steel grey to yellow green is especially sharp, and occurs with 0.01 cc. of 1/50 N HCl. Better than methyl green is "Lichtgrün F. S." (GRÜBLER) in the same concentration. It is more stable than the methyl green, but any clear and stable green colour may be applied.

Apparatus and equipment are the same as described by the author previously (1940).

### Procedure.

The procedure for the analysis of 1 cc. of plasma will be described.

The blood is prevented from coagulation by 0.15 per cent of dry neutral potassium oxalate. It is drawn and centrifuged anaerobically after the directions of PETERS and VAN SLYKE (1932). If not handled anaerobically, the procedure of VAN SLYKE and CULLEN is chosen (VAN SLYKE and CULLEN 1917, PETERS and VAN SLYKE 1932).

In one 50 cc. Erlenmeyer flask, which contains 2 cc. of distilled water, is delivered 1 cc. of plasma. In another 50 cc. flask is delivered 3 cc. of filtered 1/25 N  $\text{Ba(OH)}_2$  solution. A rubber cuff of suitable calibre is moistened with distilled water and put on the neck of the latter flask. Immediately before connecting

the two flasks,  $\frac{1}{2}$  cc. of 10 per cent sulfuric acid is dropped from a burette into the plasma water mixture. The flasks are kept in a horizontal position when connected, that no plasma can enter the  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  solution or vice versa. They are placed in the rotator previously described (WENNESLAND 1940), and rotated for  $1\frac{1}{2}$  hour. Then they are disconnected, and 10 drops of the mixed indicator described under "Reagents" are dropped into the flask which contains excessive  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  and precipitated  $\text{BaCO}_3$ . The excess of  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  is determined by titration with  $\frac{1}{50}$  N HCl.

The blanks are made in the same way without plasma.

### Calculation.

The content of carbon dioxide is found by the formula:

$$\text{CO}_2 = (b_1 - b_2)f,$$

where  $b_1$  is the number of cc. of HCl required for the titration of the blank,  $b_2$  is the number of cc. of HCl required for the analysis.  $f$  is the concentration of the HCl. When kept in a stoppered bottle, the hydrochloric acid keeps its concentration for months.

If one wants to express the contents of carbon dioxide in volume per cent,  $f$  is multiplied by  $\frac{22.4 \times 100}{2}$ .

Example:  $b_1 = 6.08$  cc. of  $\frac{1}{50}$  1.02 N HCl

$b_2 = 3.02$  cc. " "

$$f = \frac{1}{50} 1.02 \times \frac{22.4 \times 100}{2} = 22.86,$$

$\text{CO}_2 = 69.62$  vol. per cent.

### Details.

The filtering of the barium hydroxide solution through a sufficiently fine filter is important. About double the quantity of the day's use ought to be filtered into a clean flask. When the 3 cc. for the analyses and the blanks are taken from the bottom of the flask, the overlying layer protects the reagent from being changed by the carbon dioxide of the air, and it keeps nearly the same concentration, even when a long series of determinations are made. To prevent eventual changes of the barium hydroxide solution from influencing the precision of the determinations, individual

blanks are taken, each preparation of an analysis being immediately followed by a corresponding blank.

However, the most important precaution to get accurate results, is to keep the expiratory air away. The content of carbon dioxide of the atmospheric air is rather constant during the analysis, and is corrected for in the blanks. If however any of the expiratory air enters the Erlenmeyer flasks before they are connected, the analysis is spoiled. This is most easily prevented by working against a stream of air from an electrical fan. The fan is placed at the height of the face, and blows the expiratory air behind the worker. The Erlenmeyer flasks are kept at the same height during the preparation.

The plasma is delivered from a 1 cc. pipette adjusted for delivery between two marks. An ordinary pipette adjusted for outblow delivery may also be used, but must be blown out by a rubber balloon.

Originally the 10 per cent sulfuric acid was placed in a very small bottle, which was laid into the 50 cc. Erlenmeyer flask containing the plasma. In this way the acid was kept out of contact with the plasma, until the two Erlenmeyer flasks had been connected. Then the bottle was tilted over, and delivered the sulfuric acid. Experiments showed however, that no carbon dioxide was lost, if the sulfuric acid was dropped from a burette into the plasma immediately before the Erlenmeyer flasks were connected.

The final titration ought to be performed in as near as possible equal time for the blanks and the samples, and with no more stirring than necessary. A time of outflow of the hydrochloric acid of about 1 minute is proper, and the content of the flask is whirled cautiously and smoothly around, without splashing. I chose as the end-point of the titration of the blanks a brilliant yellow green colour, but in the analyses the end-point colour will always be a little more grey green because of the precipitate of barium carbonate. If the titration has gone a little too far, one can add a little excess of 1/50 N sodium hydroxide and anew reach the end-point with HCl.

If one has not a rotator like that described by the author (1940) or a similar one, and an analysis is to be made only occasionally, one gets almost as good results by leaving the flasks still over night (16—20 hours), as it was also found to be the case with the carbon monoxide analyses (WENNESLAND 1940).

## Results.

In one series I have analysed by the present method the carbon dioxide contents of freshly prepared standard solutions of sodium carbonate, whose concentration was determined in 3 other ways:

1) By weight and calculation. Sodium carbonate was prepared from  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  p. a. (MERCK) by heating for 1—2 hours in an oven at  $290^\circ \text{C}$ . 1 liter of a  $1/15 \text{ N}$  solution was prepared by weight, and in the same way 1 liter of a  $1/20 \text{ N}$  and of a  $1/25 \text{ N}$  one.

2) By direct titration against  $1/50 \text{ N HCl}$  using methyl orange as indicator following KOLTHOFF's directions. From the titration result was subtracted 0.01 cc. of  $1/50 \text{ N HCl}$  required to give the chosen end-point in a  $\text{CO}_2$ -free control water blank.

3) By direct titration against  $1/50 \text{ N HCl}$  using the mixed indicator described under "Reagents".  $1/50 \text{ N HCl}$  was added in excess to 1 cc. of the sodium carbonate solution, and a few grains of pumice stone. The mixture was heated to the boiling point, and kept boiling 3—4 minutes to drive out all carbon dioxide. It was cooled, 10 drops of the mixed indicator were delivered into it, and from a burette was added  $1/50 \text{ N NaOH}$ , until the colour became violet. Then  $1/50 \text{ N HCl}$  was added drop by drop until the colour changed into brilliant green. The content of sodium carbonate present corresponded to the difference between total  $\text{HCl}$  and the  $\text{NaOH}$  used. To the result was added 0.01 cc. of  $1/50 \text{ N HCl}$  representing the titration error found by handling a  $\text{CO}_2$ -free control water blank in a similar way. The  $\text{HCl}$  was adjusted against a  $1/20 \text{ N}$  standard sodium carbonate solution prepared independantly of the solutions above.

In Table I the results of my first series are seen. There is good agreement between the values found by the present method and the three others. All of the differences between the calculated values and the values found by the present method, lie within 3 times the standard error of the difference.

In another series I examined the carbon dioxide contents of 1 cc. of plasma by the present method, and compared them to determinations by the volumetric method of VAN SLYKE (VAN SLYKE 1917, PETERS and VAN SLYKE 1932). The results are seen in Table II. The mean coefficient of variation of the values found by the present method, is about 1 per cent of the values concerned,



Table I.

*Analyses of Standard Sodium Carbonate Solutions for Carbon Dioxide.*

The values found by the present method compared to the calculated values and to the values found by direct titration with methyl orange as indicator and with a mixed indicator. 1 cc has been used for all analyses. CO<sub>2</sub> contents in vol. per cent.

Normality of the solutions	Present method (a) Mean of 12 analyses		Calculated values (b) Vol. per cent	Difference between b and a Vol. per cent	Standard error of the difference multiplied by 3. Vol. per cent	Direct titration Mean of 6 analyses	
	Vol. per cent	Coeff. of variation				Methyl orange Vol. per cent	Mixed indicator Vol. per cent
1/25 N.	44.89	1.5	44.80	- 0.09	± 0.58	44.87	44.73
1/20 N.	55.55	1.2	56.00	+ 0.45	∓ 0.58	55.97	55.97
1/15 N.	74.08	1.0	74.67	+ 0.59	± 0.64	74.71	74.61

Table II.

*Analyses of Plasma for Carbon Dioxide.*

Present method compared to the volumetric method of Van Slyke. 1 cc. has been used for all analyses. Mean of 12 double analyses. CO<sub>2</sub> contents in vol. per cent.

	Present method.		The volumetric method of Van Slyke.		Difference between the present method and the method of Van Slyke. Vol. per cent
	Vol. per cent.	Coeff. of variation.	Vol. per cent.	Coeff. of variation.	
Sample 1. . . .	70.70	0.9	71.03	0.4	- 0.33
> 2. . . .	70.66	1.2	69.96	0.4	+ 0.70
> 3. . . .	69.92	1.3	69.97	0.4	- 0.05
> 4. . . .	72.65	0.8	72.24	0.4	+ 0.41
> 5. . . .	71.01	0.8	71.02	0.6	- 0.01
> 6. . . .	71.04	0.7	70.53	0.4	+ 0.51
> 7. . . .	70.91	0.9	71.21	0.4	- 0.30
> 8. . . .	72.06	0.9	71.47	0.4	+ 0.59
> 9. . . .	70.44	1.0	70.78	0.7	- 0.29
> 10. . . .	69.63	1.0	69.97	0.6	- 0.34
> 11. . . .	70.62	1.1	70.05	0.4	+ 0.57
> 12. . . .	63.38	1.0	63.86	0.5	- 0.48
Mean of 144 analyses.	70.25	1.0	70.17	0.5	+ 0.08

by the method of VAN SLYKE the coefficient of variation is about the half. The mean standard error of the difference between the values found by the two methods is 0.23 vol. per cent. Only one of the differences slightly exceeds 3 times the error, viz. that of sample 2 with a difference of 0.70 vol. per cent. The coefficient of variation of that sample is however rather large (1.2 per cent of 70.66), and if applied to the calculation of the standard error of the difference, the latter is found to be 0.26 vol. per cent, multiplied by 3 is 0.78 vol. per cent.

The difference of the mean of all 144 analyses is 0.08 vol. per cent. The standard error of the same difference is 0.07 vol. per cent, multiplied by 3 it is 0.21 vol. per cent.

I have examined the results of analyses without rotation of the flasks (Table III). They were prepared as usual, but lay still overnight (18 hours).

Table III.

*Analyses of Plasma and of a Standard Sodium Carbonate Solution for Carbon Dioxide.*

The flasks were left lying still 18 hours. Present method compared to the volumetric method of Van Slyke, and in the analysis of sodium carbonate also to calculated value and to the value found by direct titration. 1 cc. has been used for all analyses. CO<sub>2</sub> contents in vol. per cent.

	Present method.		The volumetric method of Van Slyke		Direct titration. Mean of 6 analyses. Vol. per cent.	Calculated value. Vol. per cent.
	Mean of 12 analyses. Vol. per cent.	Coeff. of variation	Mean of 12 analyses. Vol. per cent.	Coeff. of variation		
Plasma . . .	65.24	1.3	64.80	0.4		
1/20N sodium carbonate. .	55.73	1.4	55.36	1.6	55.92	56.00

Finally I have examined the influence of time on the reaction, when the flasks are rotated (Fig. 1), and when they are left lying still (Fig. 2). When rotated, maximum values are attained after 90 minutes, whether plasma or a pure sodium carbonate solution is examined. When left lying still, maximum is reached after 15—16 hours.

Further experiments are being carried out to determine the ammonia contents of biological fluids in a similar way.

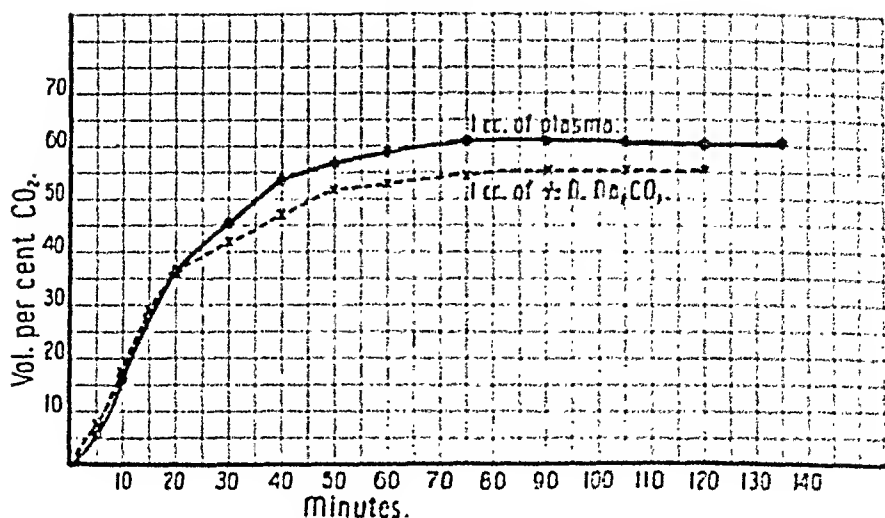


Fig. 1. Analyses of Plasma and of a Standard Sodium Carbonate Solution for Carbon Dioxide.

Empirical curves showing the correlation between analysis values and reaction time, when the flasks have been rotated.

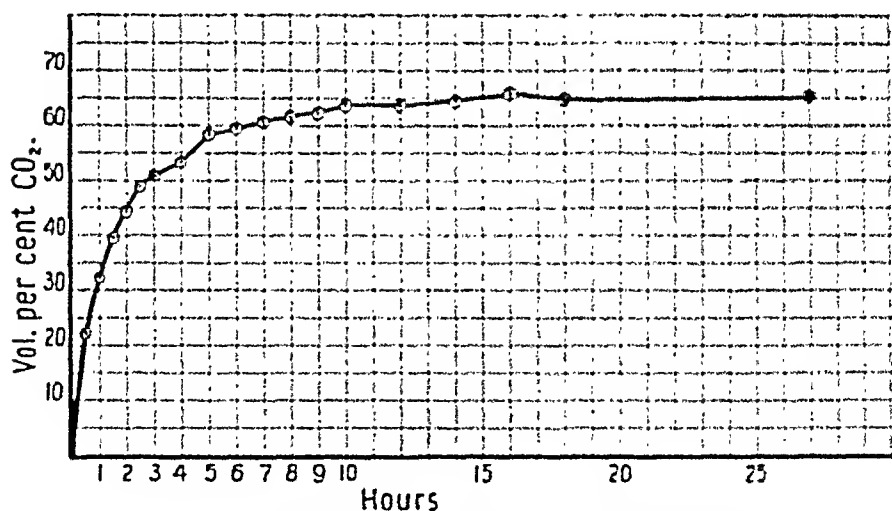


Fig. 2 Analyses of 1 cc. of Plasma for Carbon Dioxide.

Empirical curve showing the correlation between analysis values and reaction time, when the flasks have been left lying still.

### Summary.

The principle and apparatus described by the author to determine carbon monoxide in blood, can be applied for analyses of other volatile substances of biological fluids.

In this paper it is used for the determination of carbon dioxide. A known quantity of the fluid under examination is delivered into an Erlenmeyer flask, and the carbon dioxide is liberated by sulfuric acid in excess. Another flask containing a known quantity of barium hydroxide solution is connected with the first one by an airtight rubber cuff. The carbon dioxide is absorbed by the barium hydroxide and precipitated as barium carbonate. The excess of barium hydroxide is determined by titration with hydrochloric acid. Original barium hydroxide is determined in a blank, which also includes correction for the carbon dioxide present in the reagents and in the atmospheric air.

#### References.

- KOLTHOFF, I. M.: Die Massanalyse II. Berlin 1931.  
PETERS, J. P. and D. D. VAN SLYKE: Quantitative Clinical Chemistry.  
Vol. II, Methods. London 1932.  
VAN SLYKE, D. D.: J. Biol. Chem. 1917, 30, 347.  
—, and G. E. CULLEN: Ibid. 1917, 30, 289.  
WENNESLAND, R.: Acta Physiol. Scand. 1940, 1, 49.
-

## Titrimetric Determination of the Carbon Monoxide Binding Capacity of Blood.<sup>1</sup>

By

R. WENNESLAND.

---

In a previous paper I have described a new method for the determination of carbon monoxide in blood (WENNESLAND 1940).

When the content of carbon monoxide of a blood sample has been determined, it will often be of interest to decide how great a part of the total hemoglobin is bound to the carbon monoxide. The total content of hemoglobin may be found by one of the ordinary methods, colorimetric or gasometric. The gasometric methods are superior to the colorimetric in accuracy, and generally involve determination of either the carbon monoxide capacity or the oxygen capacity. In many cases carbon monoxide capacity determinations are preferable. Blood from smokers, motor-car drivers and other people who have been in contact with carbon monoxide, often contains small quantities of the gas, which represent a marked source of error, when oxygen capacity determinations are made, as they are not driven out when the blood is saturated with air in the ordinary way. ENGHOF (1937) found in 13 of 168 examined cases a significant difference of 0.4—1.7 vol. per cent between the oxygen capacity and the carbon monoxide capacity of the same blood. All of the persons included in the differences were smokers (except possibly one).

I have myself examined smokers and found the contents of carbon monoxide in their blood ranging from 0.15—2.05 vol. per cent, depending upon the quantities of tobacco used, the manner of smoking and the time elapsed since the indulgence.

---

<sup>1</sup> Received 8 April 1941.

When the oxygen capacity of blood containing many microbes is to be analysed, the microbes will rapidly combust some oxygen and give too low values. Also in the latter case determination of the carbon monoxide capacity will be preferable (HALDANE 1899—1900).

I have applied my method for the determination of carbon monoxide in the blood to determine the carbon monoxide capacity. It is as easy to perform as the former, and is practical in cases where great accuracy is wanted, and where any disadvantages are connected with the determination of the oxygen capacity. Especially if my titrimetric method has been used to determine the content of carbon monoxide of a blood sample, it will be natural to apply it also to the carbon monoxide capacity determination of the same blood.

### Principle.

The blood is saturated with carbon monoxide, and its content of the gas determined as described previously (WENNESLAND 1940). To correct for physically dissolved carbon monoxide, a portion of distilled water of the same temperature is saturated with the same gas. An equal part of water is analysed in the same way as the blood, and serves as a blank.

The use of water for the blanks is based upon the hypothesis, that the solubility of carbon monoxide in water is nearly the same as in blood. This is stated to be the case for oxygen and nitrogen by SENDROY, DILLON and VAN SLYKE (1934). For carbon monoxide it is not yet experimentally confirmed. VAN SLYKE and HILLER (1928) apply the same principle to correct for physically dissolved carbon monoxide. To make the error which might originate from a greater difference between the solubility of the gas in the blood and in water, as small as possible, they saturate the blood with carbon monoxide under low pressure (about 25 mm. Hg). I have applied a similar technique, using carbon monoxide-nitrogen mixtures of  $\frac{1}{10}$  or  $\frac{2}{10}$ , but with pure carbon monoxide I have obtained as good results.

### Procedure.

3—4 cc. of blood are drawn into an air-free glass syringe of 20 cc. or greater. The blood is prevented from coagulation by

some anticoagulant, heparin, potassium oxalate or sodium citrate. The carbon monoxide gas is sucked in after the blood to the 20 cc. mark. The tip of the syringe is closed by a little rubber tip with a nail, as described by SCHOLANDER (1938). In another syringe the same quantities of distilled water and carbon monoxide are sucked in. Both syringes are rotated about 30 minutes in the rotary mechanism described by the author (1940) or in a similar one.

After ENGHOFF's suggestion (1937) the syringes are placed in an oblique position of about  $5^\circ$  to the axis of rotation. In this way the blood is not only rotated, but also driven to and fro in the lengthwise direction of the saturator.

When the saturation is completed, the content of carbon monoxide is analysed as described (WENNESLAND 1940). I take however only  $\frac{1}{2}$  cc. for the analysis, as the quantities of carbon monoxide generally present in 1 cc. of saturated blood come too near the oxidizing power of the palladium chloride used. (The usual portion of 2 cc. of  $1/100$  N  $\text{PdCl}_2$  is capable of oxidizing a theoretical maximum quantity of 22.4 vol. per cent of CO in 1 cc. of blood.) Naturally one can enlarge the quantity of palladium chloride by using 3 cc. of the  $1/100$  N solution or 2 cc. of a somewhat stronger one, but I have preferred to reduce the quantity of the blood. The general reagents and procedure may then be applied in all details. The only difference concerns the calculation, where the factor F must be multiplied by 2, as will be evident from the formula for the calculation of F (WENNESLAND 1940).

$\frac{1}{2}$  cc. of water saturated with carbon monoxide is used for the blanks, and in all respects handled as the blood analyses. The blanks include corrections for physically dissolved carbon monoxide in the blood, and for small quantities of the gas in the laboratory air.

The carbon monoxide capacity is calculated by the formula:

$$\text{CO vol. per cent} = (b_2 - b_1) 2 F,$$

where  $b_1$  is the cubic centimeters of thiosulfate required to titrate the blank,  $b_2$  is the thiosulfate required for the blood analysis. F is found in Table V of my previous paper, when the thiosulfate has been adjusted against 5 cc. of  $1/200$  N standard potassium iodate solution.

### Details.

I will recommend the rotary mechanism previously described (WENNESLAND 1940). It is easily made, and if one has not an electrical motor, it can be driven by a water wheel. The latter is made from a large cork stopper with blades of thin metal plates. It is placed on the same axis as the corks carrying the analysis flasks, and is driven by a flow of water from the water tap. The axis can rest on two bearings, each on one side of the sink. With good pressure on the water the rotary mechanism is driven around quickly enough, but not so smoothly as by an electrical motor.

The carbon monoxide gas used for the saturation, was prepared after the directions of PETERS and VAN SLYKE (1932). It was bubbled repeatedly through alkaline sodium hyposulfite solution to free it from oxygen. In some experiments I used pure carbon monoxide, in others carbon monoxide diluted by nitrogen in proportions of  $\frac{1}{10}$  and  $\frac{2}{10}$ . Even a concentration of  $\frac{1}{10}$  of carbon monoxide is sufficient to saturate all hemoglobin of 3—4 cc. of blood. But to be sure also that the tension of carbon monoxide in the blanks at the end of the saturation was the same as in the blood syringes, I renewed the gas mixture in the syringes after 15 minutes, when the diluted carbon monoxide was used. The first portion was expelled, and a new one sucked in.

### Results.

In one series the carbon monoxide capacity was determined by the present method and by a modified method of SENDROY and LIU (SENDROY and LIU 1930, WENNESLAND 1940), and compared to the oxygen capacity of the same blood, determined after VAN SLYKE-NEILL (PETERS and VAN SLYKE 1932). The carbon monoxide saturations were performed with CO/N<sub>2</sub> mixtures of  $\frac{1}{10}$  and  $\frac{2}{10}$ , except in sample 7 where pure carbon monoxide was applied. The oxygen saturations were made with air, following ENGHOFF's directions (1937). Corrections for physically dissolved oxygen were taken from SENDROY, DILLON and VAN SLYKE (1934).

As the blood in some cases originated from students, who had smoken a cigarette or more the same day, and the oxygen saturations in all cases were performed with laboratory air, which might contain small quantities of carbon monoxide, an extra correction was added to the values of the oxygen capacity. It was found by analysing 2 cc. of untreated blood on its content of carbon monoxide by the titrimetric method.



Table I.

*Carbon Monoxide Capacity and Oxygen Capacity Determinations.*

Present method compared to a modified method of Sendroy-Liu and the method of Van Slyke-Neill.  $\frac{1}{2}$  cc. of blood for all analyses. 2—4 double analyses. Capacity expressed as vol. per cent of blood.

	A. Present method CO capacity. Vol. per cent.	B. The mod. method of Sendroy-Liu. CO capacity. Vol. per cent.	C. The method of Van Slyke- Neill. O <sub>2</sub> capa- city. Vol. per cent.	Difference between C and A. Vol. per cent.
Sample 1. . . . .	16.97	16.74	17.17	+ 0.20
"  2. . . . .	20.69	20.80	20.75	+ 0.06
"  3. . . . .	16.01	15.98	15.97	- 0.04
"  4. . . . .	21.62	21.78	21.97	+ 0.35
"  5a. . . . .	17.54	17.28	17.62	+ 0.08
"  5b. . . . .	17.38	17.53	17.57	+ 0.19
"  6. . . . .	15.75	15.45	15.58	- 0.17
"  7. . . . .	16.53	16.48	16.68	+ 0.15

In Table I it will be seen that there is quite a good agreement between the present method and the two others.

In the method of SENDROY and LIU I have introduced a syringe absorption pipette instead of the modified Hempel pipette of VAN SLYKE-HILLER.

I originally used alkaline hyposulfite with antraquinone betasulfonate in the syringe pipette for the absorption of oxygen and carbon dioxide. But sometimes I got considerable disagreement between the double analyses, as it happened that one of them lay appreciably below the two or three others, and below the results found by the titrimetric method and by oxygen capacity determinations.

To find the cause of those divergences, which were not-frequent, but when they occurred, spoiled the series, a small bubble of pure carbon monoxide was introduced into the manometric chamber, which contained 3.5 cc. of extracted, distilled water, and the pressure was read. The gas bubble was transported repeatedly to the syringe pipette and back to the manometric chamber, and the pressure was read after each transport. Sometimes it had diminished, sometimes not. I thought that perhaps a small portion of carbon monoxide was physically dissolved in the hyposulfite. In that case the solution should be saturated gradually, the diminution ought to be greatest after the first transport and finally disappear. No such regularity was however seen. I discovered that diminution took place, even when the gas bubble was transported no longer than into the capillary of the syringe pipette,

and then so quickly back to the manometric chamber, that no gas could be dissolved in the hyposulfite. I also found that the original pressure always could be restored, when after each transport the water in the chamber was extracted anew for a few seconds. It was evident that the gas which accidentally disappeared, was dissolved in the extracted water. It only occurred when the back transport of the gas bubble to the manometric chamber was followed by a very rich flow of mercury. I could evoke the same effect by letting mercury stream from the cup of the chamber through the gas bubble into the water, but only when alkaline hyposulfite solution had been used for the absorption of oxygen and carbon dioxide (Table II). Possibly the mercury which falls in small droplets through the bubble, carries some gas with it into the water. According to this, the following precautions must be taken, when hyposulfite is used: One must take care that a minimum quantity of mercury is sucked down to seal the cock. If a large flow of mercury has streamed through the gas and the water, the latter must be extracted anew for a minute or so, before the pressure is read.

Table II.

*The Decrease of the CO Pressure in the Manometric Chamber after Back Transport from the Syringe Pipette.*

The pipette was filled with hyposulfite solution. The temperature was constant.

The gas bubble was transported repeatedly from manometric chamber to the syringe pipette and back.	Pressure mm. Hg.	The gas bubble remained in the chamber while mercury was dropped repeatedly through.	Pressure mm. Hg.
Initial pressure . . . . .	393.4	Initial pressure after one transport and reextraction . . . . .	399.5
After first transport . . . . .	389.7	After a flow of mercury . . . . .	397.5
After reextraction . . . . .	393.4	After reextraction . . . . .	399.3
After second transport . . . . .	394.0	After a new flow of mercury . . . . .	398.5
After third transport . . . . .	390.5	> > > > > . . . . .	397.5
After the bubble has stood 2 hours in the manometric chamber . . . . .	388.3	> > > > > . . . . .	397.8
After fourth transport . . . . .	388.3	> > > > > . . . . .	397.0
After reextraction . . . . .	393.0	After reextraction . . . . .	399.9

With alkaline pyrogallate no diminution took place, no matter how much mercury was sucked down, and how many times the gas bubble was transported to the syringe pipette and back again. I therefore prefer alkaline pyrogallate as an absorbing fluid for the oxygen and the carbon dioxide in the method of SENDROY and LIV. Hyposulfite solutions also have the disadvantage, that a crystalline precipitate is formed

between the wall of the syringe and the piston, which makes the latter difficult to move. With pyrogallate the piston always moves smoothly and easily.

In a supplementary series (Table III) I compared the present method to determinations of the oxygen capacity. In this series I used pure carbon monoxide for the saturation, except in sample 18, where carbon monoxide diluted  $\frac{2}{10}$  was applied.

Table III.

*Carbon Monoxide Capacity and Oxygen Capacity Determinations.*

Present method compared to the method of Van Slyke-Neill.  $\frac{1}{3}$  cc. of blood for all analyses. 2 double analyses. Capacity expressed as vol. per cent of blood.

	Present method. CO capacity. Vol. per cent.	The method of Van Slyke- Neill. O <sub>2</sub> capa- city. Vol. per cent.	Diff. between O <sub>2</sub> capacity and CO capacity. Vol. per cent.
Sample 1. . . . .	20.51	20.88	+ 0.37
› 2. . . . .	19.91	20.29	+ 0.38
› 3. . . . .	17.15	17.46	+ 0.31
› 4. . . . .	19.13	19.10	- 0.03
› 5. . . . .	21.29	20.81	- 0.48
› 6. . . . .	20.76	20.45	- 0.31
› 7. . . . .	21.52	21.32	- 0.20
› 8. . . . .	19.44	19.62	+ 0.18
› 9. . . . .	20.59	20.65	+ 0.06
› 10. . . . .	20.32	20.46	+ 0.14
› 11. . . . .	21.24	21.18	- 0.06
› 12. . . . .	20.67	20.87	+ 0.20
› 13. . . . .	22.82	22.83	+ 0.01
› 14. . . . .	19.55	19.35	- 0.20
› 15. . . . .	21.56	21.41	- 0.15
› 16. . . . .	21.19	20.96	- 0.23
› 17. . . . .	20.22	20.42	+ 0.20
› 18. . . . .	18.53	18.53	± 0.00

Both Table I and III show that the agreement is as good, whether I use pure or dilute carbon monoxide for the saturation, indicating that the difference between the solubility of the gas in blood and in distilled water is too small to affect the analyses appreciably.

From the series of both tables I have calculated the methodic error of the determinations by the present method and of the oxygen capacity determinations. I have applied the same formula as ENGHOFF for the calculation, and the same nomenclature (ENGHOFF 1937 after CZUBER 1924).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma \delta_2^2 + \frac{\Sigma \delta_3^2}{2} + \frac{\Sigma \delta_4^2}{3} + \dots}{2N_2 + 3N_3 + 4N_4 + \dots}}$$

$\delta_2$  means the difference between two individual observations of one set.

$\delta_3$  means the three possible differences which can be calculated from three individual observations of one set.

$\delta_4$  means the six possible differences which can be calculated from four individual observations of one set, etc. . . .

$N_2, N_3, N_4$ , etc. . . . mean the number of sets consisting of two viz. three, four, etc. . . . observations.

ENGHOFF found for his carbon monoxide capacity determinations by the method of VAN SLYKE-HILLER, a mean methodic error ("durchschnittlicher Methodenfehler") of 0.11 vol. per cent, and for his oxygen capacity determinations 0.08 vol. per cent.

I found after the same formula for my carbon monoxide capacity determinations by the present method a mean methodic error of 0.15 vol. per cent, and for my oxygen capacity determinations I found a mean methodic error of 0.13 vol. per cent.

Considering that ENGHOFF's analyses are performed with 1 cc. of blood, and that I have worked with  $\frac{1}{2}$  cc., it is justified to suppose that the precision of the present method is nearly the same as that of VAN SLYKE-HILLER's method.

My oxygen capacity determinations are also nearly as precise as ENGHOFF's.

In Table I the results are based upon 2—4 double analyses, on the average 3. The standard error of the mean ("der mittlere Fehler der Mittelwerte") of three double analyses by the present method is 0.09 vol. per cent, of the oxygen capacity determinations of the same table the standard error is 0.08 vol. per cent. The standard error of the difference between the two arithmetical means is 0.12 vol. per cent. Differences of less than three times 0.12 are likely to occur by chance. In Table I none of the differences exceed 0.36 vol. per cent.

The results in Table III are all of them based upon the mean of two double analyses. The standard error of the carbon monoxide capacity determinations in this table is 0.11 vol. per cent, and of the oxygen capacity determinations 0.09 vol. per cent. The standard error of the difference is 0.14 vol. per cent. Only one of the differences exceeds 3 times 0.14 (sample 5 with a difference of 0.48).

In a series (Table IV) I have analysed small samples of 0.2 cc. of blood, and compared them to the ordinary analyses of 0.5 cc. The coefficients of variation were calculated in the ordinary way.

Table IV.

*Carbon Monoxide Capacity Determinations in 0.2 Cc. of Blood.*

Present method. The results of the analyses of 0.2 cc. are compared to the ordinary analyses of 0.5 cc. Carbon monoxide capacity in vol. per cent of the blood.

	Cc. analysed.	Vol. per cent.	Coeff. of variation.	Number of obs.
Sample 1. . . . .	0.2	19.20	0.4	7
	0.5	19.12		3
Sample 2. . . . .	0.2	21.36	0.6	15
	0.5	21.53	0.4	8
Sample 3. . . . .	0.2	18.76	0.9	15
	0.5	18.59	0.8	23

In the analyses of 0.2 cc. I used a solution of 1/200 N PdCl<sub>2</sub> in 1/400 N HCl. 5 cc. of 1/400 N potassium iodide was used for the precipitation, and of the filtrate an aliquot portion of 5/7 was taken.

In a final series (Table V) I have compared the carbon monoxide content of blood saturated with common illuminating gas, to that of blood saturated with <sup>2</sup>/<sub>10</sub> carbon monoxide/nitrogen mixture. The agreement was bad, indicating that illuminating gas contains interfering substances and can not be used. It is a disadvantage that the method requires an extra reagent, the carbon monoxide gas, but the latter is easily prepared. It is advisable to dilute it by nitrogen or oxygen-free air <sup>1</sup>/<sub>10</sub> or <sup>2</sup>/<sub>10</sub>, as long as the solubility coefficient of carbon monoxide in blood is not positively stated. The influence of temperature differences between the blood and the water during the saturation, is reduced to a minimum by using dilute carbon monoxide.

Table V.

*Carbon Monoxide Capacity Determinations of Blood Saturated with Pure Carbon Monoxide and with Illuminating Gas.*

Present method. 0.5 cc. of blood. 2—4 double analyses. CO capacity in vol. per cent.

	Saturated with pure carbon monoxide. Vol. per cent.	Saturated with illuminating gas. Vol. per cent.
Sample 1. . . . .	18.47	19.13
> 2. . . . .	21.50	20.59
> 3. . . . .	20.37	19.32
> 4. . . . .	19.06	19.02
> 5. . . . .	17.45	18.68
> 6. . . . .	17.86	18.81
> 7. . . . .	17.82	18.99

### Summary.

The titrimetric method of the author for the determination of carbon monoxide in blood is applied for the determination of the carbon monoxide capacity of blood.

The blood is saturated with carbon monoxide, and its content of the gas liberated by bringing it into an Erlenmeyer flask and adding 10 per cent sulfuric acid. The carbon monoxide wanders into another Erlenmeyer flask, connected with the first one by an airtight rubber cuff, and is oxidized by a known portion of palladium chloride. Excessive palladium chloride is determined iodometrically.

Blanks to correct for physically dissolved carbon monoxide are prepared by saturating water with the same gas, and analysing it in the same way.

### References.

- ENGHOFF, H.: *Quantitative Hämoglobinbestimmungen und Erythrozytenuntersuchungen.* Uppsala 1937.  
 HALDANE, J.: *J. Physiol.* 1899—1900, 25, 295.  
 PETERS, J. P. and D. D. VAN SLYKE: *Quantitative Clinical Chemistry.* Vol. II, Methods. London 1932.  
 SCHOLANDER, P. F.: *Skand. Arch. Physiol.* 1938, 78, 145.

- SENDROY, J. JR., R. T. DILLON and D. D. VAN SLYKE: *J. Biol. Chem.* 1934, *105*, 597.
- SENDROY, J. JR. and S. H. LIU: *Ibid.* 1930, *89*, 133.
- VAN SLYKE, D. D. and A. HILLER: *Ibid.* 1928, *78*, 807.
- WENNESLAND, R.: *Skand. Arch. Physiol.* 1940, *83*, 201.
- WENNESLAND, R.: *Acta Physiol. Scand.* 1940, *1*, 49.
-

From the Laboratory of Zoophysiology, Copenhagen University.

## The Rate of Protein Renewal in Mice and Rats Studied by Means of Heavy Hydrogen.<sup>1</sup>

By

HANS H. USSING.

---

The studies of the last few years on protein metabolism in animals by means of amino acids labelled with isotopes (especially heavy hydrogen and nitrogen) have revealed the fact that the amino acids in most proteins are constantly being replaced by amino acids derived from the food. This means 1) either that new protein is constantly formed at a fairly high rate and a corresponding amount hydrolysed simultaneously 2) or amino acid radicals in the proteins may be replaced by amino acids of the same kind from the surrounding medium without breakdown of the protein, 3) or finally that both processes may contribute to the result found.

In this paper the first assumption is held, although it is recognized that the second possibility cannot be entirely ruled out at present (vid. SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG 1939 a).

The results hitherto obtained by feeding experiments with marked amino acids are mainly of a qualitative nature as it is impossible from the observations to calculate the rate of protein synthesis (or amino acid replacement). What makes these calculations difficult is that we cannot determine the concentration of free marked amino acids in the blood and in the cells and secondly that our knowledge of the composition of the tissue protein is still far from being complete.

An approach to the problem of protein formation may, however, be made using a slightly different principle. If a certain concentration of  $D_2O$  is maintained in the water-phase of an animal, the

<sup>1</sup> Received 16 April 1941.



concentration of stable D (D in C—D combination) in the proteins of the animal will increase, beginning with zero at zero time and approaching asymptotically a constant value at a rate characteristic for each type of protein.

This exchange of H and D-atoms between the proteins and the water does not, apparently, proceed directly. The most probable explanation is (FOSTER, RITTENBERG and SCHOENHEIMER, 1938) that the D is introduced into the free amino acids during metabolic processes like deamination and reamination, transamination (BRAUNSTEIN and KRITZMANN, 1937) and similar processes, or amino acids may even be synthesized from carbohydrate or other substances of non-protein origin. When subsequently these D-containing amino acids are used in protein synthesis the D is introduced into the protein.

The most simple possibility would be that the uptake of D in the amino acids was carried to an end very rapidly, so that the D-content of the amino acids available for synthesis was the same at every given moment. In this case the relation between D content of a single protein and time could be given by the equation:  $y = K(1 - a^t)$ ,  $y$  being the D-content,  $t$  the time,  $K$  the asymptotical value for  $y$  and  $a$  a constant ( $0 < a < 1$ ).

The formula indicates that in the beginning of the process all protein built up contains D, whereas all protein broken down is free from D. As time goes on an ever greater part of the protein broken down will contain D and the increase in D will slow down and ultimately reach a constant value  $K$ .

The demand that the D uptake of amino acids shall have reached its maximum before the amino acids are used in protein synthesis is not quite fulfilled for all amino acids. In a previous paper (USSING 1941) it was shown that glutamic acid containing 3 D-atoms, presumably in  $\alpha$  and  $\gamma$  position, did not carry any D into the liver protein when the amino acid was used in feeding experiments with mice. Leucine containing D in  $\alpha$ -position did on the other hand introduce D in the liver protein although the losses may have been considerable. In experiments with ordinary amino acids and heavy water in the body fluid this would mean that amino acids in which H and D in certain (C—H) positions is relatively easily exchanged introduces much D into proteins, so that glutamic acid introduces 3 D atoms whereas leucine in which H and D in  $\alpha$ -position is exchanged somewhat more slowly introduces less than one atom in the protein.

In a study of the fate of leucine containing heavy nitrogen and heavy hydrogen in metabolism SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG (1939 a) states that in a three days experiment more than one third of the heavy N was replaced by ordinary N in the part of the leucine which was still labelled with D. In feeding experiments with tyrosine marked with heavy nitrogen (SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG 1939 b) it was found that the isotopic tyrosine nitrogen did only account for 25 % of the total marked nitrogen deposited in the protein. 75 % had been transferred to other protein constituents. Furthermore it is pointed out by VIGNEAUD, COHN, BROWN, IRISH, SCHOENHEIMER and RITTENBERG (1939) that during the process of transamination the chance for exchange of  $\alpha$ -hydrogen is considerably higher than the chance for loss of nitrogen. The rate of hydrogen exchange in various amino acids is obviously different, but it may be regarded as sufficiently high to allow the use of the exponential equation as an approximative description of the D uptake in protein of animals whose body fluid is kept at a constant  $D_2O$ -level.

It should be pointed out that the formula still holds true in the case that a definite proportion of the molecules of some amino acids has not exchanged H with D if this proportion is kept constant as a resultant of D uptake and supply of D free molecules from without.

### Methods.

As experimental animals male mice and rats were used. At the beginning of the experiments the animals were given an injection of  $D_2O$ -Ringer subcutaneously, sufficient to raise the  $D_2O$ -concentration in the body fluid to the level wanted. The food given was in most cases a mixture of equal amounts of butter, rye flour and dry milk. This pasty mixture had a content of 10 % water only and very nearly the same percentage of protein. As drinking water 5 %  $D_2O$  was used. Together with the water formed in metabolism a mixture of about 2.5—3 %  $D_2O$  was produced in the animals and this level was as a rule aimed at when the initial injection was performed.

At the end of the experimental period the animals were killed, the mice by stunning, the rats by bleeding from one carotid which was cut during ether narcosis and the blood was collected in a centrifuge vessel powdered inside with oxalate. The organs

Table I.

Days	D <sub>2</sub> O-content in body water, units	D <sub>2</sub> O-content in combus- tion water from myo- sin, units	D <sub>2</sub> O-content in combus- tion water from >myo- >, units	D in combustion water in per cent of D in body water	
				myosin	>myogen>
1	2,560	23	177	0.90	6.9(?)
3	2,702	44	90	1.63	3.33
7	2,740	65	102	2.37	3.72
14	2,764	147	254	5.32	9.18

which were to be analysed were cut with scissors and pressed gently with filter paper to remove part of the fluid in the inter-spaces. Subsequently the organs were treated in one of two different ways, both of them for the purpose of removing deuterium in labile (ionogen) or semilabile (for instance in ortho-position to the hydroxy group in tyrosine) combination in the protein. The method most commonly employed (method I) was that after drying, extraction with acetone, ether and petrol ether the organs were hydrolysed for 18 hours with 33 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 105°. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was removed quantitatively with Ba(OH)<sub>2</sub>. The BaSO<sub>4</sub> precipitate was washed three times with boiling water and the amino acid solution including the three washings was evaporated to dryness. The carbohydrates which might have been present in the organs are destroyed during the hydrolysis. The other method used (method II) consisted in drying by grinding with acetone immediately after excision of the organ. The resulting powder was extracted with ether and then boiled with acetate buffer (pH 4.9). The fluid containing carbohydrate, free amino acids and other extractives was discarded and the protein boiled for at least one hour in an excess of water, after which the water was evaporated on a steam bath and the protein subsequently dried in an oven at 105°. If the boiling with water was maintained for half an hour only, constant results could not be obtained.<sup>1</sup>

The amino acid mixture of the first method or the dried protein of the second one was ignited and the D<sub>2</sub>O-content in the combustion water determined by the method of LINDERSTRØM-LANG and LANZ (1938). The two methods for removing labile and semilabile deuterium led to essentially concordant D-content

<sup>1</sup> See however "Addendum"!

Table II.<sup>1</sup>

	Days	D <sub>2</sub> O-content in body water, units	D <sub>2</sub> O-content in combus- tion water	D in combus- tion in per cent of D in body water
Normal food . . . . .	1	2,537	138	5.44
'  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '	1	2,869	144	5.02
'  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '	1	2,673	127	4.76
'  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '	1	3,340	185	5.53
Protein free diet . . . . .	1	2,492	142	5.70
'  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '  '	1	2,735	140	5.12

in the protein. The D<sub>2</sub>O-content of water distilled from a sample of tissue taken immediately after killing the animal was determined as representing the body fluid.

The D<sub>2</sub>O-content is given in the tables as excess density  $\times 10^6$ . One unit is approximately = 1 mg% D<sub>2</sub>O.

The blood was in most cases separated into corpuscles and plasma and the corpuscles washed with Ringer-solution which was afterwards combined with the plasma, in order to gain hemoglobin and plasma protein for the study of the formation rate of the blood proteins.

Muscle was in several cases (rat) separated in myosin and a fraction ("myogenfraction") consisting of the protein soluble in water or very dilute salt-solutions. In separating myosin the method of EDSALL (1930) was followed.

The finely cut muscle was treated with 3—4 vol. 1.2 M KCl solution in an icecooled beaker, the mixture being mechanically stirred during the extraction lasting two hours. The pH was kept at about 7.4 during this procedure. Afterwards the mixture was filtered, the filtrate adjusted to pH 7.0 and diluted with about 15 vol. water. The myosin precipitates immediately. The supernatant fluid was decanted and the myosin separated from the rest of solution by centrifuging. In our experiments no attempts were made to further purify the myosin. The solution freed from most of the myosin was heated to 52° and the small amount of protein separating out was filtered off. This probably consisted mainly of myosin which had not been removed by the first precipitation.

<sup>1</sup> The results presented in table II are obtained by method II.

The proteins still in solution were precipitated with metaphosphoric acid which was added until further addition did not produce any more precipitate.

## Results.

### a) Rate of D-Uptake in Different Organ Proteins in Rats and Mice.

Figure 1 shows the results of a series of experiments on mice. The ordinate is the content of D in the organs in per cent of the D-content of the body fluid. The abscissa is the time in days.

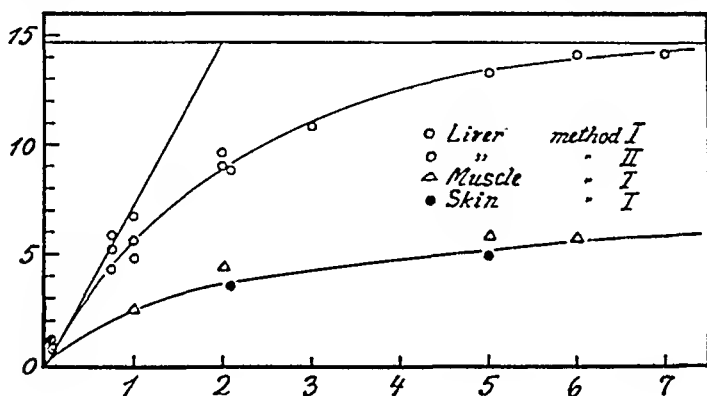


Fig. 1.

The curve drawn through the points of the determinations on liver is the function  $y = 14.6(1 - 0.607^t)$ . The tangent to the curve at zero time indicates the initial velocity of D-uptake in the proteins. Differentiation of the formula and insertion of  $t = 0$  gives 7.3 %/day. As D-uptake and protein renewal are proportional and the D-content is maximally 14.6 % this means that about half the protein of the liver should be replaced per day.

Turning to the muscle and the skin, it looks at the first glance as if the curve which approximately represents both follows a similar law as that for the liver, differing from it mainly by having a much lower asymptote. Experiments made in this laboratory (KROGH and USSING 1938) have shown, however, that a young rat kept from before birth and later for 1 month with a constant level of  $D_2O$  in the body fluid had a content of stable D in the muscle protein of about 16 % of the D-content in the water phase. These 16 % must represent very nearly the asymptotical value.

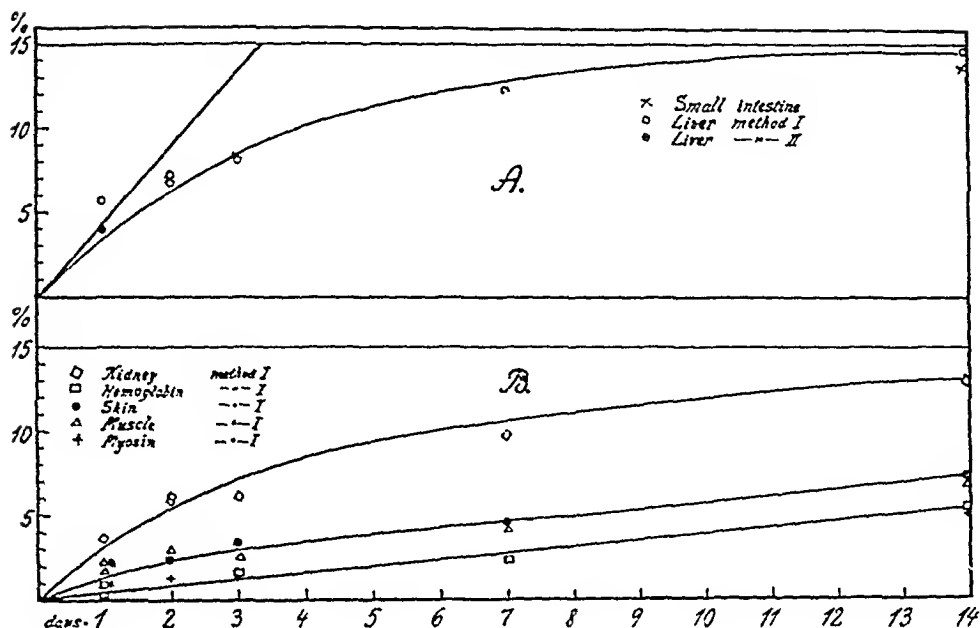


Fig. 2.

If a similar amount is to be reached in the muscle of mice, the curve cannot be described by an exponential function, the increase being too steep in the beginning. This means either that our preliminary hypothesis is false or that the muscle (and skin) protein is a mixture of proteins with very different formation rates. That the last explanation is the right one is strongly indicated by the fractioning experiments on rat muscle.

Figure 2 presents the results on rats. Liver and small intestine follow essentially the same curve and show the highest rate of D-uptake. A little lower lies the curve of the kidney and still lower the curve common for total muscle and skin. The curve for liver and small intestine (fig. 2 A) represent the function  $y = 15(1 - 0.757^t)$ . The initial velocity of D-uptake is 4.33 %/day which means that about 29 % of the protein is renewed per day. It is uncertain whether the deviation shown by a single point at one day is due to experimental error or whether the rate of D-uptake is really higher in the beginning of the experiment than expressed by the exponential curve. The curve for kidney and that for muscle and skin (2 B) deviate from exponential curves in the same way as did the curve for mouse muscle and skin. The increase in the first one or two days is too high; and probably the explanation is the same in all cases. The difference in formation

rate of the proteins from each organ is too high to allow an overall determination of the formation rate of the mixture. Probably this difficulty can be overcome by using single proteins or mixtures of very nearly related proteins for the experiments. Attempts in this direction were made with myosin and hemoglobin (strictly speaking washed red corpuscles). The preparations are described above.

The points indicating the relation between D-content and time for myosin and hemoglobin are lying on the same curve, which within the space of time investigated (14 days) may be regarded as a straight line. Whereas reasons may be given why the curve for hemoglobin should be a straight line (see later), the myosin curve is more probably a rather flat exponential curve. This view may be supported by the find that muscle protein of a rat run for two months in a similar experiment had reached a D-content of 8 % of that of the body fluid, whereas the asymptotical value (that of muscle of a young rat grown from before birth with a D<sub>2</sub>O containing medium in the body) was found to be approximately 16 %. (KROGH and USSING l. c.). If the curve for total muscle is to pass through 8 % at 60 days it is necessary that the curve for myosin which constitutes some 60 % of the muscle protein is also a curved line.

The determinations on the "myogen" fraction are not shown in the figure as only in a few cases sufficient (ca 200 mg) protein was recovered to allow a determination. The results are shown in table 1 together with corresponding values for myosin. The D-uptake is evidently higher for the "myogen" fraction. If the asymptotical value for D-uptake is estimated to be approximately the same for all muscle protein constituents, the formation rate for the "myogen" fraction must be higher than that for myosin. The D-uptake of blood plasma proteins was only determined in one case. After two days the D-uptake was 5.5 % whereas the corresponding D-uptake for hemoglobin was in two experiments 0.8 % and 1.2 % respectively.

In the case of plasma proteins a high formation rate may also be presumed.

### b) Influence of Variations in Feeding on D-Uptake in the Liver Protein.

It is a well known fact that feeding a high protein diet leads to an augmentation of liver protein, whereas liver protein during inanition is used up at a faster rate than protein from other organs.

It was thought possible, therefore, that a protein free diet would produce a considerably lower protein formation in liver as measured by the D-uptake. The results of 2 such experiments are shown in table 2 together with 4 experiments in which the usual diet, containing 10 % protein was used. No difference between livers from the two groups is seen, but the dispersion, which is rather large may conceal a difference of minor magnitude. In a 2 days experiment with rats, one of which got a 30 % protein diet, whereas the other one was starved during the experimental period, the high protein animal reached 7.2 % D-uptake in the liver protein, whereas the starved one reached 6.9 %. From these experiments it is seen that if nutrition has any influence at all upon the D-uptake, such influence is not considerable.

### Discussion.

A question of the utmost importance for the interpretation of the results presented here is whether it is possible for the proteins in living animals to exchange stable H with D without the protein being more or less completely disintegrated and rebuilt. The above discussion presupposes that such a direct uptake of D in the proteins, if at all, will only take place to a negligible extent compared with the uptake of D through protein formation from D containing amino acids. A fact which speaks in favour of this assumption is that feeding amino acids marked with heavy N (SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG 1939 a) to rats produces a high heavy N-content in those proteins which in the experiments presented here show a rapid D-uptake (liver, small intestine, kidney, blood plasma) and a much lower heavy N-content in the proteins which in the D<sub>2</sub>O experiments showed a slow uptake of D (skin, muscle, red corpuscles). It is hardly possible to imagine an exchange of N-atoms in a protein without a splitting of peptid bonds and the complete accordance between the indications of protein renewal given by heavy N marked leucine and by the D<sub>2</sub>O



method seems to indicate that the D-uptake is really a measure of protein formation.

Experiments which are in progress have shown that the proteins of liver slices of rats and mice kept for two hours in 25 % D<sub>2</sub>O Ringer solution in an oxygen atmosphere took up a hardly measurable amount of D only while the respiration was quite normal as measured by the oxygen consumption or the CO<sub>2</sub> production. These experiments indicate that the D-uptake is not necessarily tied up with respiration.

Assuming now that the D-uptake is a measure of protein renewal, we may examine somewhat more closely the results described in the foregoing chapter. The curves seem to indicate that proteins from organs rich in cytoplasm as liver, small intestine and kidney is rapidly renewed, whereas renewal is slower in fibrillar organs like connective tissue (skin) and muscle. The form of the curves for muscle and skin moreover indicate a very different formation rate of different fractions of the organ proteins in question and the fractioning of muscle in myosin and "myogen" fraction proved this to be true. It is likely that cytoplasm protein from muscle and skin has a similar formation rate as that of liver protein.

The hemoglobin showed a very slow formation rate and this is what would be expected. The red corpuscles having no nucleus and a hardly perceptible metabolism are not likely to have the ability of synthesizing hemoglobin. Accordingly all D found in hemoglobin must have come there by new formation of red corpuscles and in the case of hemoglobin the curve is a measure of the renewal of red corpuscles. If the red corpuscles have a relatively well defined life time, which is now the opinion commonly held, no D containing corpuscles will be destroyed until after approximately one life time, and the D-content of the hemoglobin should therefore increase after a straight line until that time.

We have not as yet determined the maximum value for D-uptake in hemoglobin. As the lower limit for this maximum value may be taken 11 % which should be all  $\alpha$ -hydrogen. The real maximum value is probably a little higher as some of the dispensable amino acids may be synthesized from carbohydrate or similar substances. If the maximum value is taken to be 14 % and the amount reached in the rat experiment after 14 days is estimated from the curve to be about 5.0 % the life time of corpuscles should be about 40 days which is very nearly the value most commonly indicated for corpuscles in man.

It seems rather astonishing that the D-uptake of plasma proteins is high as indicated by the single case in which a determination was performed. The find cannot, however, be rejected, as SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG (l. c.) on feeding rats heavy N-leucine found a very high heavy N-content in the plasma protein, an amount comparable with that in liver and small intestine protein. It has long been known that plasma protein, especially globulin is rapidly formed after a blood loss. The isotope experiments appear to indicate that plasma protein formation is always going on at a fairly high rate, but under normal circumstances the breakdown keeps pace with the formation.

As seen from the foregoing chapter all attempts to influence the D-uptake into protein through protein starvation have failed. This seems to indicate that protein formation is going on at about normal rate even when amino acids are not supplied from without. This is apparently only possible if the hydrolysis is speeded up in protein inanition, because the over all result is a decrease in protein amount due to inevitable amino acid katabolism. At present we have no means of testing this hypothesis.

That no difference is to be found in the D-uptake of proteins between animals getting a different protein supply may, however, be explained in some such way as the following. The amount of D entering the proteins depends upon two factors: The rate of protein synthesis and the D-content of the amino acids. If it is possible by a high amino acid supply to lower the mean D-content in the amino acids available for synthesis, it is obvious that an augmented protein synthesis may be accompanied by a lowered D-content in the new formed protein so that the total rise in D-content is not higher than is the case on a low protein diet. If this is the case the asymptotical value of D-content in an organ protein should be higher on a low protein diet.

Experiments are being planned to study this matter.

Finally it should be stressed that although the rates of protein renewal which have been determined in this paper are considerable they seem well within the limits of possibility. For instance liver and kidney slices kept under oxidative conditions give off an amount of amino acids + urea or ammonia which is of the same order of magnitude as the breakdown of protein determined by the D<sub>2</sub>O method. Using the paper of KREBS (1933) the mean amount of amino acid given off by rat liver slices was per hour ca 1.6 % of the dry substance and the amount of urea calculated

as amino acid was ca 1 %. This means that in less than 40 hours all dry substance would be used up if the initial rate of breakdown was maintained.

I wish to express my gratitude to Professor KROGH for the great interest he has taken in my work. I am indebted to Mrs. SCHAUFUSS who has assisted me in carrying out the experiments.

The expenses have been born out of a grant from the Rockefeller Foundation to Professor BOHR and Professor KROGH.

### Summary.

A method is described for measuring the rate of renewal (hydrolysis and resynthesis) of tissue proteins.

The principle is that when a constant concentration of heavy water is maintained in the body fluid of an animal the free amino acids take up a certain amount of deuterium in stable (C—H) positions by transamination and other processes. When these amino acids are used in protein synthesis, the D-content of the protein increases at a rate which may be described by an exponential function. By this method the rate of renewal for mouse liver protein was found to be 50 % per day and for rat liver protein (and protein from small intestine) the renewal was about 29 % per day.

Protein from kidney, muscle and skin was apparently mixtures with different rates of renewal. This view was proved to be right for muscle which was fractionated into myosin and a "myogen" fraction, the first with a very slow formation rate and the second with a high one.

Hemoglobin was found to be very slowly renewed probably due to the lack of a nucleus in the red corpuscles. The increase in D-content with time in hemoglobin is accordingly a measure of red corpuscle formation.

Serum protein is renewed rather quickly, at a rate comparable with liver protein.

### References.

- BRAUNSTEIN, D. F. and M. G. KRITZMANN, *Enzymologia*, 1937, 2, 129.  
EDSALL, J. T., *J. Biol. Chem.* 1930, 89, 289.  
FOSTER, G. L., D. RITTENBERG and R. SCHOENHEIMER, *Ibidem.* 1938, 125, 13.  
KREBS, H. A., *Z. Physiol. Chem.* 1933, 217, 191.  
KROGH, A. and H. USSING, *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.* 1938, 22, 282.  
LINDERSTRØM-LANG, K. and H. LANZ, *Ibidem.* 1938, 21, 315.

- SCHOENHEIMER, R., S. RATNER and D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.* 1939 a, 130, 703.  
— — —, *Ibidem.* 1939 b, 127, 333.  
USSING, H. H., *Acta Physiol. Scand.*  
VIGNEAUD, VINCENT DU, M. COHN, G. BROWN, O. IRISH, R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.* 1939, 131, 273.
- 

### Addendum.

Experiments now in progress have shown that the D-uptake by mouse liver protein in experiments of a weeks duration or more as determined by method II turns out considerably higher (about 18 % of the body water concentration instead of 14.5 %) than the corresponding values found by method I.

Also in experiments of short duration a similar difference between the two methods has now been proved to exist; in our earlier experiments this difference was however masked by the fact that the protein prepared for hydrolysis according to method I contained substances (possibly free amino acids) with a rather high D content, whereas such substances were removed in method II.

If the protein used in method I is extracted with trichloroacetic acid or boiling acetate-acetic acid mixture prior to hydrolysis, the result is 4.5 %—4.8 % as compared with 5.5 % according to method II.

The fact that the relation between results gained by the two methods is approximately the same in short and long experiments suggests that both methods give a description of the same fundamental process: the renewal of protein. The difference between the two methods is at least partly due to the uptake of one mole water per amino acid residue during hydrolysis.

On account of the prevailing conditions we have only a very limited amount of heavy water at our disposal and it is impossible therefore to obtain the material for a full correction of the curves given in this paper. The general results presented in the foregoing pages will, however, hardly be affected by such a correction although certain of the numerical values calculated for the rates of protein formation may prove to be somewhat too high.

*Hans H. Ussing.*

---

From the Laboratory of Zoophysiology, Copenhagen University.

## The Fate in Metabolism of Deuterium Introduced in some Amino Acids by Heating with $D_2O$ and $H_2SO_4$ .<sup>1</sup>

By

HANS H. USSING.

---

In a previous paper (USSING, 1938) it was stated that feeding a rat amino acids in which heavy hydrogen was introduced by heating with  $D_2O$  and  $H_2SO_4$  resulted in D-containing proteins in the liver of the rat. It was assumed that the D was introduced in  $\alpha$ -position in all amino acids and possibly in the ring of the cyclic acids by the treatment used, viz. heating to  $170^\circ$  for 24 hours with 50 %  $D_2O$  in 33 %  $H_2SO_4$ .

Since then, however, some evidence has accumulated which seemed to make a reexamination of the problem necessary. Through the work of BRAUNSTEIN and KRITZMANN (1937) it has been made probable that in the cell a continuous "transamination" is going on, a transfer of amino-groups to  $\alpha$ -keto-acids with the formation of an amino acid from the keto acid and vice versa. It is evident that this process leads to the loss of D placed in  $\alpha$ -position in the reacting amino acids.

The importance of transamination or similar processes in the living animal has been shown in the investigations by SCHOENHEIMER et al. using amino acids containing heavy nitrogen in feeding experiments. SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG (1939) found that feeding rats leucine containing heavy nitrogen, at least one third of the isotope in the leucine was replaced by ordinary nitrogen in the proteins of the animals.

---

<sup>1</sup> Received 16 April 1941.

The following experiments were made to find out if D atoms in other positions than the  $\alpha$ -position are responsible for the D-content found in liver protein when animals are fed heavy amino acids prepared as mentioned above (USSING l. c.). A full survey of the problem could naturally be reached if all known amino acids were separately made "heavy" and each preparation used in feeding experiments. The following experiments should serve merely as an orientation and only some characteristic amino acid fractions are used.

A sample of casein (15 g) was hydrolysed by boiling with 33 %  $H_2SO_4$  for 48 hours, the  $H_2SO_4$  was removed quantitatively and the resulting amino acid solution extracted 36 hours with butanol. Of the mixture of monamino acids remaining after evaporation of the butanol, a sample (1.0 g) was made to take up D by treatment with 0.67 g  $H_2SO_4$  and 2.67 g  $D_2O$  for 24 hours at  $170^\circ$ .

Mice were fed a mixture of 1 g butter, 1 g rye flour and 1 g dry milk + 100 mg of heavy monamino acids per day. After 2 or 3 days the animals were killed, the liver taken out, dried at  $100^\circ$  and extracted with acetone, hot 50 % ethanol, 96 % ethanol and ether. (The use of 50 % ethanol was introduced to remove free amino acids, which on account of the high D-content in the amino acids fed, might possibly have interfered with the result.) The D-content of the water formed by combustion of the liver protein was determined by the gradient method of LINDERSTRÖM-LANG and LANZ (1938) after purification performed in a distillation apparatus worked out in this laboratory (USSING and WERNSTEDT 1940). A determination of the D-content of the body water was made on a water sample distilled from the excised thigh muscles of the animal. The results are shown in table 1. The  $D_2O$  content is given in excess density multiplied with  $10^6$ . The units approximately correspond to mg %  $D_2O$  in the combustion water. It is seen, that the monamino acid fraction by itself can produce a considerable formation of D-containing protein. The monamino acid mixture used was taken to be made up mainly by the following amino acids: leucine, valine, phenyl alanine and tyrosine. It was therefore not unlikely that the benzene-ring in the two aromatic amino acids was responsible for the D introduced in the protein.

Accordingly two experiments were made, one using pure leucine instead of the amino acid mixture and one with a mixture of 40 % tyrosine and 60 % of a crude preparation of phenyl-

anine (as no pure phenylalanine was available at that time). From the table it is seen that the food rich in aromatic amino acids produces a D-content in the liver perhaps even higher, than the monamino acid mixture first used. On the other hand the leucine alone produces an unquestionable result. In a previous paper (USSING 1939) it was shown that the D-uptake in leucine by treatment with  $D_2O$  and  $H_2SO_4$  at  $170^\circ$  is located in the  $\alpha$ -position. From this it follows that the processes leading to the introduction of leucine in the protein molecule do not necessarily involve the complete loss of D in  $\alpha$ -position. On the other hand the losses may be considerable but the present results do not justify a true quantitative treatment of the matter.

Apart from the aromatic amino acids the dicarbonic amino acids are known to take up D in more than one position by the treatment with  $D_2O$ ,  $H_2SO_4$  and heat. Experiments in this laboratory have shown that both glutamic acid and aspartic acid take up three D-atoms in stable (or semistable RITTENBERG, KESTEN, SCHOENHEIMER and FOSTER, 1938) combination. A feeding experiment performed with "heavy" glutamic acid (see table) shows, however, that compared with the high D-content in the food only a trace of D was introduced into the livers of the animals. The high  $D_2O$ -content in the water distilled off from the animals shows that most of the glutamic acid has taken part in processes in which the D has been set free. This is in accordance with experiments performed in this laboratory which show that when glutamic acid is incubated with minced muscle in a  $D_2O$  containing solution at  $37^\circ$  for 3 hours an amount of D is taken up by the glutamic acid in stable position corresponding to more than one H-atom. (It should be emphasized that no measurable amount of D is taken up in control experiments where no minced muscle is present.) That glutamic acid is playing a conspicuous part in certain metabolic processes is also seen from the investigations of SCHOENHEIMER, RATNER and RITTENBERG l. c. They showed that when leucine containing heavy N was fed to rats heavy N was found in all amino acids isolated from the animals (except lysine), but glutamic acid next to leucine had the highest percentage of heavy N.

Table 1.

Food per day	Units D <sub>2</sub> O in combustion water from amino acid mixture feed	Duration of experi- ments. Days	Units D <sub>2</sub> O in distil- late	Units D <sub>2</sub> O in combus- tion water from liver protein
100 mg ›heavy› monamino acids + 3 g normal food mixture	9,500	3	41	187
›	9,500	3	27	172
›	9,500	2	32	67
100 mg ›heavy› leucine + 3 g normal food mixture	7,400	3	40	101
›	7,400	3	35	82
100 mg ›heavy› tyrosin and phenylalanine mix- ture + 3 g normal food mixture	11,000	3	49	210
›	11,000	3	44	183
100 mg ›heavy› glutamic acid 1.5 g starch 1.5 g butter	24,000	1	16	24
100 mg ›heavy› glutamic acid + 3 g normal food mixture (10% protein)	24,000	3	64	44
›	24,000	3	68	34

## Summary.

Leucine labelled with D in  $\alpha$ -position produces on feeding to mice a certain uptake of D in the liver proteins, indicating that part of the labelled leucine has entered the protein molecules without loss of D. Glutamic acid, labelled with 3 D-atoms per molecule by heating with D<sub>2</sub>O and sulfuric acid, produced only negligible D-uptake in liver protein in similar feeding experiments. A mixture of tyrosine and phenylalanine made "heavy" by a similar treatment introduced so much D into liver protein of mice as to indicate that D-situated in the ring was responsible for at least part of the D-uptake of the liver protein.



## Literature.

- BRAUNSTEIN, D. F. and M. G. KRITZMANN, *Enzymologia* 1937, 2, 129.  
LINDERSTROM-LANG, K. and C. R. LANZ, *Lab. Carlsberg, ser. chim.*  
1938, 21, No. 24.  
RITTENBERG, D., A. KESTEN, R. SCHOENHEIMER and G. FOSTER, J.  
*Biol. Chem.* 1938, 125, 1.  
SCHOENHEIMER, R., S. RATNER and D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.*  
1939, 130, 703.  
USSING, H., *Nature* 1938, 142, 399.  
—, *Nature* 1939, 144, 977.  
—, A. WERNSTEDT, *Skand. Arch. Physiol.* 1940, 83, 169.
-

From the Biochemical and Physiological Laboratories,  
A.B. Astra, Södertälje, Sweden.

## On the Activity and Structure of Vitamin K.<sup>1</sup>

By

BERTIL SJÖGREN and CARL GUSTAV SUNDBERG.

---

When it was discovered that vitamin K<sub>1</sub> was 2-methyl-3-phytyl-1.4-naphthoquinone, a great number of naphthoquinone derivatives were examined for their vitamin K effect. The simple compound, 2-methyl-1.4-naphthoquinone, has proved specially active. Vitamin K activity is found only in the series of 1.4-naphthoquinones or among compounds supposed to be convertible into such quinones in the organism (for outline of literature, see DAM, GLAVIND and KARRER, 1940; FIESER, TISHLER and SAMPSON, 1941; SJÖGREN, 1941), perhaps with some exceptions (phlorone, ANSBACHER and FERNHOLZ, 1939; purpurin, MARTIN and LISCHER, 1941). In addition, the effect is due to the methyl group in the 2-position. Apparently, however, the activity is also dependent upon another condition, which has to do with the substitution in the 3-position. What groups can be allowed, without risking the intensity of the effect, is a matter which it is too early to decide. The unsubstituted compound, 2-methyl-1.4-naphthoquinone, is very active, while substitution in the 3-position with simple radicals, such as hydroxyl, methyl, amino etc., brings the effect down to a minimum. Some 2-methyl-3- $\beta$ -alkenyl-1.4-naphthoquinones, however, such as 3-farnesyl and 3-geranyl, are relatively potent (FIESER and co-workers, 1941).

We have already reported our estimations of the activity of different naphthoquinones (SJÖGREN, 1939). Since then we have done our investigations in large parallel series, comprising particularly vitamin K<sub>1</sub>,<sup>2</sup> 2-methyl-1.4-naphthoquinone and the diacetate

<sup>1</sup> Received April 21st, 1941.

<sup>2</sup> Natural vitamin, obtained from Prof. P. KARRER, Zürich, through the mediation of Prof. H. THEORELL, Stockholm.

of the corresponding hydroquinone. We consider that the values we have obtained are now reliable enough to permit of discussion. They may also throw light on the rôle of the 3-substituent in the vitamins  $K_1$  and  $K_2$ .

We used DAM's method for the standardization (DAM and GLAVIND, 1938) and gave the preparation dissolved in alcohol. DAM's method is complicated, but it is no doubt the most accurate one. One proof is the great disparity between the figures for the activity obtained with other methods in U. S. A. (cf. ANSBACHER, 1941). As a rule, however, it has been found there that the relation between the effects of vitamin  $K_1$  and 2-methyl-1.4-naphthoquinone lies between 1 : 2 and 1 : 4. The attached table shows the activities which we found for the three substances we gave special study. For comparison, we have also put in the values found in two other laboratories. The estimations were done independently of ours, but with the same method. We have not included the values obtained with other methods, as they cannot be converted to DAM units with any degree of certainty, even when a standard substance is used. As appears from the table, the values obtained with DAM's method in the different laboratories agree closely. The activity of vitamin  $K_1$  may be considered to be approximately 12 million DAM units per gram, and that of 2-methyl-1.4-naphthoquinone about 30 million. However, as different animal stocks may react differently, average values of the activities obtained at different laboratories are of less interest than the relation between the activities of the different compounds obtained at the same laboratory.

Judging from the available reports, the phytyl group in the 3-position in vitamin  $K_1$  has nothing to do with the specificity. The question is whether it influences the effect in another manner. Vitamin  $K_1$  has much less effect per unit of weight than the simple 2-methyl-1.4-naphthoquinone. What is the relation between the effects, however, if we only consider the amount of methyl-naphthoquinone contained in the vitamin molecule (38 per cent)? If the activity of the latter compound is put at 30 million DAM units per gram, vitamin  $K_1$  should have an effect of 11.4 million, if the phytyl group does not affect the activity otherwise than by increasing the molecular weight (with 25 million for the quinone, 9.5 million is obtained for the vitamin). The value is in good agreement with the 12 million observed. However, the methods of estimation are not accurate enough,

C o m p o u n d	Activity determined according to Dam's method (expressed in Dam units per gram)		
	Sjögren-Sundberg 1939 and later determinations	Hepding-Moll 1939	Dam-Glavind-Karrer 1940
2-methyl-3-phytyl-1.4-naphthoquinone (vitamin K <sub>1</sub> ) . . . . .	12-14 million	—	12 million
2-methyl-1.4-naphthoquinone . . . . .	30-35 million	35 million	25 million
2-methyl-1.4-naphthohydroquinone-diacetate . . . . .	20 million	—	14 million

in our opinion, to prevent the conclusion that the phytyl group is of no immediate importance to the activity of the vitamin; it neither increases nor decreases the effect, nevertheless it may have another function. Support for this conclusion is found if a corresponding calculation is done for vitamin K<sub>2</sub>, which to all appearances is of the same nature as vitamin K<sub>1</sub>, except as regards the group in the 3-position. According to KARRER, the group may be a squalen radical, i. e., an unsaturated hydrocarbon group consisting of two farnesyl groups coupled opposite one another (KARRER and EPPRECHT, 1940) or an isomeric radical with the farnesyl groups after one another (KARRER and EPPRECHT, 1940; BINKLEY and co-workers, 1940). The elementary composition of this vitamin, however, is C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub> and its molecular weight 580. If the group in the 3-position does not affect the activity, it should amount to 7.4 million, if the methyl-quinone has an activity of 25 million. If the quinone activity is taken as 30 million, a value of 8.9 million is obtained for the vitamin. The value found by DAM, GLAVIND and KARRER (1940) for the activity of vitamin K<sub>2</sub> is 8 million.

ALMQUIST (1940) assumes that the long side chain of the vitamins is split off in the organism. FIESER (1941), on the other hand, suggests that the potency of the methyl-naphthoquinone may be due, not to the functioning of the compound as such, but to its conversion by biosynthesis in the organism into a quinone of the true vitamin K type by reacting with an unsaturated alcoholic component. He also supposes that a branched chain isoprenoid structure of the 3-substituent is favorable for the antihemorrhagic activity and that the carbon content is a factor of importance.

Our conclusion is compatible with both these opinions. It is obvious, however, that certain substituents in the 3-position, especially the ones of the vitamins  $K_1$  and  $K_2$ , have no direct influence on the size of the potency.

### Summary.

It is known that the phytyl group in vitamin  $K_1$  (2-methyl-3-phytyl-1.4-naphthoquinone) has nothing to do with the specificity of the vitamin. The authors present strong arguments for the supposition that it also does not influence the effect in relation to 2-methyl-1.4-naphthoquinone, other than what corresponds to the higher molecular weight. On molecular ground, the two compounds have practically the same effect. If vitamin  $K_2$  has an analogous composition to vitamin  $K_1$ , except as regards the group in the 3-position, the same may apply to this vitamin.

### References.

- ALMQUIST, H. J., and A. A. KLOSE, *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, 1940. 45. 55.
- ANSBACHER, S., and E. FERNHOLZ, *J. Biol. Chem.* 1939. 131. 399.
- ANSBACHER, S., *J. Nutrit.* 1941. 21. 1.
- BINKLEY, S. B., R. W. MCKEE, S. A. THAYER and E. A. DOISY, *J. Biol. Chem.* 1940. 133. 721.
- DAM, H., and J. GLAVIND, *Biochem. J.* 1938. 32. 1018.
- DAM, H., J. GLAVIND and P. KARRER, *Helvet. Chim. Acta* 1940. 23. 224.
- FIESER, L. F., M. TISHLER and W. L. SAMPSON, *J. Biol. Chem.* 1941. 137. 659.
- HEPDING, L., and TH. MOLL, *Mercks Jahresber.* 1939. 53. 5.
- KARRER, P., and A. EPPRECHT, *Helvet. Chim. Acta* 1940. 23. 272.
- MARTIN, G. J., and C. F. LISCHER, *J. Biol. Chem.* 1941. 137. 169.
- SJÖGREN, B., *Z. physiol. Chem.* 1939. 262. I.
- SJÖGREN, B., *Nord. Med.* 1941 (in press).
-

## Über die Bedeutung der Lungen als Blutdepot beim Menschen.<sup>1</sup>

Von

TORGNY SJÖSTRAND.

---

Aus einer Anzahl von Beobachtungen an Tieren scheint hervorzugehen, dass die Lungen als Blutdepot eine wichtige Rolle spielen. So findet man schon bei einer Gewichts- oder Eisenbestimmung an Lungen von durch Dekapitieren getöteten Tieren (Mäuse und Ratten), dass die Blutmenge bei verschiedenen physiologischen und durch Pharmaka hervorgerufenen Zuständen hochgradig wechseln kann. Die grössten Blutmengen weisen Lungen von Tieren auf, welche sich vor dem Tode in verhältnismässiger Ruhe befunden hatten; wesentlich geringere findet man bei Tieren, die vor der Tötung umhergelaufen waren, gereizt, mit verschiedenen Narkotika eingeschläfert, in Narkose operiert worden waren, oder Injektionen mit Adrenalin, Morphinum, Alkohol usw. erhalten hatten (T. SJÖSTRAND, 1934, 1935).

Die grossen Blutmengen in den Lungen bei Tieren in einem verhältnismässigen Ruhezustand können — wenigstens zum grösseren Teil — nicht agonal oder postmortal entstanden sein, da man solche Blutansammlungen auch dann findet, wenn die Tiere durch gleichzeitige Durchschneidung des Halses und der Herzbasis getötet worden waren. Eine morphologische Analyse der Lungen von durch plötzliches Gefrierenlassen in flüssiger Luft getöteten und mittels der Altmannschen Gefrier-Vakuumtechnik fixierten und eingebetteten Tieren hat ergeben, dass das Blut bei grösserer Ansammlung in den Lungen in weiten si-

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 26. April 1941.

nuösen Blutgefäßen und in stark erweiterten Venen Aufnahme findet (F. SJÖSTRAND und T. SJÖSTRAND, 1938).

Diese Stütze für die Annahme einer Blutdepotfunktion der Lungen wurde bei Versuchen erhalten, die Blutverteilung und den Zustand der Blutgefäße unter verschiedenen Verhältnissen rasch zu fixieren. Ein Studium dieser Funktion mit den üblichen experimentalphysiologischen Hilfsmitteln an narkotisierten und operierten Tieren erscheint nicht möglich; werden die Tiere in einem dieser Zustände auf die oben bezeichnete Weise getötet, so findet man keine derartigen Ansammlungen, und ebensowenig ist es bisher gelungen, solche experimentell mit physiologischen Reizen verschiedener Art oder durch Einfluss verschiedener Pharmaka zu erzeugen. Der Zustand mit gefülltem Blutdepot, in dem sich intakte Tiere in verhältnismässiger Ruhe befinden, scheint sich also nach gröberen Eingriffen nicht experimentell hervorrufen zu lassen.

HOCHREIN und KELLER (1933) haben geltend gemacht, dass die Lungen die Rolle eines Blutdepots spielen, und zwar auf die Weise, dass sie Blut bei denjenigen Zuständen aufspeichern, wo die Milz ihr Depotblut abgibt. Die Autoren konnten mittels der Thermostromuhr nachweisen, dass der Blutgehalt der Lungen unter dem Einfluss von beispielsweise Adrenalin zunahm. Ihre Deutung des Begriffes Blutdepot findet indessen nicht allgemeine Zustimmung, und es liegt vielleicht näher, eine Zunahme der Blutmenge in den Lungen bei Zuständen, wo der Kreislauf als Ganzes in Mitleidenschaft gezogen wird, auf andere Weise zu erklären.

Auf einem ganz anderen Wege, welcher sich indessen ebenfalls von dem bei experimentellen Studien über die Blutzirkulation üblichen unterscheidet, ist man zu der Annahme gekommen, dass die Lungen als ein wirkliches Blutdepot dienen sollen. HAMILTON und MORGAN (1931) fanden, dass die seit langem bekannte Abnahme der Vitalkapazität beim Menschen bei Übergang von der stehenden zur liegenden Stellung nicht eintritt, wenn man die Blutzirkulation in den unteren Extremitäten mit Druckmanschetten aufhebt. Die Autoren erklären dies so, dass das in den unteren Extremitäten hydrostatisch festgehaltene Blut, wenn dasselbe entleert wird, in die Lungen wie in ein der Milz ähnliches Blutdepot aufgenommen wird.

Diese Beobachtungen wurden von ASMUSSEN, HOHWÜ-CHRISTENSEN und SJÖSTRAND (1939) bestätigt, welche u. a. noch nachweisen, dass die Abnahme der Vitalkapazität nicht auf einer Ver-

mehrung des Bauchinhalts beruhen kann. BUDELMANN (1937, 1938) hat auch eine bestimmte Beziehung zwischen der Vitalkapazität und der Blutmenge in den unteren Extremitäten gefunden. Wurden Stauungsbinden so angelegt, dass die Blutmenge in den letzteren zunahm, dann wurde auch die Vitalkapazität grösser. BUDELMANN (1937) gibt ferner an, dass die Vitalkapazität nach Injektion von Sympathol in therapeutischen Dosen steigt, aber von Adrenalin oder grossen Sympatholdosen bei Versuchspersonen in liegender Stellung herabgesetzt wird.

Aus diesen Versuchen geht zweifelsohne hervor, dass eine Beziehung zwischen der Blutverteilung und der Vitalkapazität besteht. Um aber mit vollem Recht hieraus einen sicheren Schluss auf eine aktive Depotfunktion der Lungen ziehen zu können brauchen wir einige weitere Data. So ist aus den erwähnten Untersuchungen nicht ersichtlich geworden, dass die Veränderungen der Vitalkapazität auf einem Schwanken der Blutmenge in den Lungen beruhen: die Vitalkapazität kann sich auch auf andere Weise ändern. In gleichzeitig mit dieser Arbeit veröffentlichten Untersuchungen mittels Orthodiagraphie und Analyse von Röntgenbildern ist indessen nachgewiesen worden, dass die Abnahme der Vitalkapazität nicht oder nur zu einem kleineren Teil von einer Änderung der Herzgrösse oder der Blutfüllung in den grösseren Thorakalgefässen bedingt sein kann (JONSELL und SJÖSTRAND, 1941). Da sich auch keine Veränderung der Gefässzeichnung in den Lungen feststellen liess, bleibt wohl als einzige mögliche Erklärung übrig, dass die geringere Vitalkapazität auf einer Ansammlung von Blut in den peripheren Gefässen der Lungen beruht.

In der vorliegenden Arbeit wird die Frage gestreift, welche Faktoren das in den Lungen angehäuften Blut zur Entleerung bringen können. Hierbei wurden einige gefässbeeinflussende Pharmaka hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Vitalkapazität nach Herabsetzung der Blutmenge in den unteren Extremitäten geprüft. Ferner wurde ein Vergleich zwischen der Grösse der aus den unteren Extremitäten entleerten Blutmenge und der gleichzeitigen Veränderung der Vitalkapazität sowie über die Vitalkapazitätsschwankungen in der gewöhnlichen aufrechten und liegenden Stellung angestellt.



## Methodik.

Die Vitalkapazität wurde mit dem Krogschen Spirometer gemessen. In der Regel wurden bei jedem Versuch drei Messungen vorgenommen. HAMILTON und MORGAN (1931) sowie ASMUSSEN, HOHWÜ-CRHISTENSEN und SJÖSTRAND (1939) haben nachgewiesen, dass das Residualluftvolumen bei derartigen Variationen der Vitalkapazität konstant bleibt oder auch in derselben Richtung wie die letztere variiert. Bei dieser Untersuchung wurde es daher nicht für erforderlich gehalten, weitere Bestimmungen hierüber auszuführen.

Die Variationen der Blutmenge in den unteren Extremitäten wurden dadurch hervorgerufen, dass die Versuchspersonen auf ein Liegebrett gelegt wurden, welches um  $60^\circ$  gegen die Horizontalebene geneigt war, wobei sich der Kopf der Versuchsperson unten befand, oder indem die letztere rittlings auf einer Stütze hing, also mit dem Kopf nach oben. Nach 5—10 Minuten in der ersteren Stellung und 15—20 Minuten in der letzteren wurde der Blutzufluss zu den unteren Extremitäten mittels pneumatischer Manschetten am oberen Teil der Oberschenkel abgesperrt. Dann wurde das Liegebrett in die Horizontallage gebracht, und im Laufe von  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden wurden die Bestimmungen ausgeführt; während dieser Zeit konnte die Abschnürung beibehalten werden.

Das Beinvolumen wurde mit genügender Genauigkeit durch die Messung des Deplacements bestimmt. Die maximale Differenz in vier Bestimmungen desselben Beines (6,800 l) war so nur 0.015 l.

Als Versuchspersonen dienten hauptsächlich zwei Kandidaten der Medizin. Beide sind geradezu athletisch gebaut und normalgross, 174 cm bzw. 176 cm (G—t und W—d). Da die Versuche sich mit längeren oder kürzeren Pausen über fast ein Jahr erstreckten und die Werte bei verschiedenen Versuchsgelegenheiten gut übereinstimmten haben sich die Versuchspersonen als besonders geeignet erwiesen. Ausserdem wurden einzelne Versuche an einer asthenischen Versuchsperson vorgenommen, wobei sich aber jeweils mehr fluktuierende Werte ergaben, weshalb sich dieses Individuum zu Untersuchungen über das normale Verhalten weniger eignete.

### Die Vitalkapazität bei gewöhnlicher aufrechter und liegender Stellung sowie nach künstlich hervorgerufenen Blutverschiebungen.

Wenn die Lungen als Blutdepot beim Menschen eine grössere Rolle spielen, so ist zu erwarten, dass sowohl in liegender wie aufrechter Stellung Blut aus denselben entleert werden kann, und dass die Lungen bei exzessiver Entleerung von Blut aus den Beinen dasselbe ganz oder teilweise aufnehmen. Es wurde daher

ein Vergleich zwischen der Vitalkapazität in gewöhnlicher aufrechter und liegender Stellung und im Liegen nach Entleerung oder Füllung der unteren Extremitäten mit Blut vor der Abschnürung in der oben bei der Beschreibung der Methodik angegebenen Weise angestellt. Tab. 1 ist eine Zusammenstellung der hierbei erhaltenen Werte.

Tab. 1.

*Die Vitalkapazität in aufrechter und liegender Stellung sowie in liegender Stellung nach Entleerung und Füllung der Beine mit Blut durch passive Lageänderungen.*

Versuchsperson	Datum	Vitalkapazität in l		Differenz in l	Vitalkapazität in l		Differenz in l
		stehend	liegend		blutleere Beine	blutgef. Beine	
G-t	23.11.	4.66	4.46	0.170	4.42	4.86	0.410
		4.61			4.35	4.78	
		4.63	4.47		4.42	4.80	
		M = 4.63	M = 4.46		M = 4.40	M = 4.81	
G-t	25.11.	4.60	4.43	0.160	4.84	4.77	0.860
			4.43		4.43	4.75	
		4.56	4.40		4.44	4.75	
		M = 4.58	M = 4.42		M = 4.40	M = 4.76	
W-d	16.11.	4.38	4.29	0.060	4.13	4.43	0.260
		4.32				4.49	
		4.33	4.28		4.26	4.47	
		M = 4.34	M = 4.28		M = 4.20	M = 4.46	
W-d	27.11.	4.39	4.11	0.160	3.99	4.54	0.460
			4.23		4.00	4.37	
		4.29	4.21		4.03	4.51	
		M = 4.34	M = 4.18		M = 4.01	M = 4.47	

Nach Untersuchungen von HAMILTON und MORGAN (1931) dürfte man zu der Annahme berechtigt sein, dass die Änderung der Vitalkapazität beim Übergang von aufrechter zu liegender Stellung hauptsächlich durch eine Verschiebung von Blut bedingt ist. Es muss daher zulässig sein, die beiden Differenzen in Tab. 1 direkt miteinander zu vergleichen. Diese zeigen, dass neben den Blutverschiebungen, welche beim Übergang von liegender zu aufrechter Stellung zwischen Thorax und unteren Extremitäten erfolgen, beim Einnehmen von passiver Hängelage eine beträchtliche Blutmenge aus dem Thorax entleert werden kann. Während die Differenzen zwischen der Vitalkapazität in aufrechter und

liegender Stellung bei drei Versuchen 160—170 ml betragen, erreichen dieselben bei den mehr exzessiven Blutverschiebungen 360—460 ml.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, dass die Lungen auch bei aufrechter Körperhaltung grosse Blutmengen abgeben können, und dass die Grenze ihrer Kapazität in liegender Stellung nicht erreicht wird. Es handelt sich auch um recht erhebliche Blutmengen (7 % des Gesamtblutes), welche in der gewöhnlichen liegenden Stellung aus dem Thorax entleert werden können, ohne dass sich sagen liesse, der Kreislauf im übrigen sei in höherem Grade verändert.

### Die Beziehung zwischen den Variationen des Beinvolumens und der Vitalkapazität.

Um zu einer Entscheidung über die Beziehung zwischen den Veränderungen der Vitalkapazität und der Blutmenge, welche vor der Abschnürung in den beiden Stellungen in den Beinen angesammelt bzw. aus denselben entleert worden war, zu gelangen, wurde nach der Bestimmung der Vitalkapazität das Volumen des einen Beines gemessen. Dieser Wert wurde dann mit 2 multipliziert, um eine Mass der totalen Blutmenge zu erhalten, welche nach den unteren Extremitäten hin oder von diesen her verschoben worden war (Tab. 2).

Aus Tab. 2 wird ersichtlich, dass der erhaltene Wert für die Veränderung des Beinvolumens recht gut mit der Änderung der Vitalkapazität übereinstimmt. Bei Versuchen, wo die Schwankungen verhältnismässig klein waren, findet man keine regelmässige Abweichung in der einen oder anderen Richtung; die vorliegenden Abweichungen dürften hier auf die mangelnde Genauigkeit der Bestimmungsmethode zurückzuführen sein. Bei den beiden Versuchen, wo die Variationen höheren Grades waren, weist die Vitalkapazität eine etwas geringere Veränderung auf als das berechnete Beinvolumen. Die Änderung der Vitalkapazität ist hier indessen nur ea. 10 % kleiner als die des Beinvolumens.

Die gute Übereinstimmung zwischen den Variationen des Beinvolumens und der Vitalkapazität zeigt, dass Blutverschiebungen nach und von peripheren Gefässgebieten durch eine Entleerung von Blut aus dem Thorax bzw. eine Ansammlung desselben an dieser Stelle kompensiert werden. Diese Schlussfolgerung ist

völlig berechtigt, da eine Zunahme des Bauchinhalts von entsprechendem Grade keinen Einfluss auf die Vitalkapazität ausübt (ASMUSSEN, HOHWÜ-CHRISTENSEN und SJÖSTRAND, 1939).

Tab. 2.

Die Beziehung zwischen Vitalkapazität und Beinvolumen.

Versuchs- person	Datum	Vitalkapazität in l		Volum. d. r. Beines in l		Differenz in l	
		blutgef. I	blntl. Beine II	blutgef. III	blutleer IV	I/II	III/IV × 2
G-t	6.6.	4.36	4.51	6.000	6.060	0.110	0.120
		4.48	4.55				
		M = $\frac{4.42}{}$	M = $\frac{4.53}{}$				
G-t	7.6.	4.26	4.39	6.115	6.155	0.100	0.080
		4.47	4.54				
		M = $\frac{4.43}{}$	M = $\frac{4.53}{}$				
G-t	10.6.	4.44	4.77	5.720	5.945	0.390	0.450
		4.30	4.83				
		M = $\frac{4.42}{}$	M = $\frac{4.81}{}$				
W-d	20.9.	4.19	4.74	5.300	5.610	0.550	0.620
		4.21	4.73				
		M = $\frac{4.19}{}$	M = $\frac{4.74}{}$				
W-d	27.9.	4.41	4.74	4.990	5.125	0.240	0.270
		4.50	4.67				
		M = $\frac{4.47}{}$	M = $\frac{4.71}{}$				
W-d	16.11.	4.13	4.43	5.500	5.600	0.260	0.200
		4.26	4.49				
		M = $\frac{4.20}{}$	M = $\frac{4.46}{}$				

Eine derartige Zu- oder Abnahme der Blutmenge in den unteren Extremitäten dürfte mit einem Aderlass bzw. einer Transfusion entsprechender Blutmengen aus oder in den Organismus als Ganzes zu vergleichen sein. Die grössten Blutverschiebungen, welche sich auf dem hier beschriebenen Wege erzielen lassen, scheinen auch zur Erzeugung eines gewissen Grades von Kreislaufinsuffizienz zu genügen, welche sich in einer Erschwerung der Flüssigkeitsresorption aus dem Darm äussert (ASMUSSEN, HOHWÜ-CHRISTENSEN und NIELSEN, 1938). Würden beim Menschen an-

dere Organe als die Lungen als Blutspeicher eine wesentliche Rolle spielen, so wäre zu erwarten, dass man eine weniger gute Übereinstimmung zwischen den Veränderungen der Vitalkapazität und den in den unteren Extremitäten direkt nachgewiesenen Variationen der Blutmenge finden würde.

Aus diesen Versuchen mit Bestimmung der Vitalkapazität und des Beinvolumens wird ferner ersichtlich, dass die grossen Schwankungen der Vitalkapazität, welche man bei ein und derselben Versuchsperson unter identischen Versuchsbedingungen, aber bei verschiedenen Versuchsgelegenheiten findet, von Grössenvariationen der Blutverschiebung bedingt werden. Sie beruhen demnach nicht direkt darauf, dass die Lungen an den einzelnen Zeitpunkten in verschieden hohem Grade als Blutspeicher fungieren. Diese Variationen müssen mit Tonusschwankungen in der Gefässmuskulatur oder evtl. auch in der Skelettmuskulatur zusammenhängen.

### Der Einfluss einiger Blutgefässpharmaka auf die Vitalkapazität.

Um sich einen Begriff von den Faktoren, welche auf das im Thorax angesammelte Blut entleerend wirken, machen zu können, wurden einige Pharmaka herausgegriffen, welche das Blutgefässsystem in verschiedener Weise beeinflussen, wie Amylnitrit, Vasopressin, Adrenalin und Ephedrin. Als ein blutdrucksenkendes Medikament mit dilatierender Wirkung auf die peripheren Blutgefässe, in erster Linie die Arterioli, wurde Amylnitrit gewählt. Das Vasopressin repräsentiert ein Hormon mit gefässkontrahierendem und blutdrucksteigerndem Effekt, welches das Minutenvolumen und die zirkulierende Blutmenge eher verringert als vergrössert. Adrenalin und Ephedrin dagegen haben bekanntlich eine blutdrucksteigernde Wirkung, führen aber gleichzeitig zu einer Zunahme des Minutenvolumens und der zirkulierenden Blutmenge.

*Amylnitrit.* Der Effekt von Amylnitrit wurde in der Weise studiert, dass die Vitalkapazität bei blutleeren Beinen in liegender Stellung gemessen wurde, worauf die Versuchsperson Amylnitrit (auf einen Wattebausch geträufelt) zum Einatmen erhielt, bis an der Haut eine Gefässerweiterung zu konstatieren war. Dann wurde möglichst rasch nach der Inhalation die Vitalkapazität

von neuem gemessen. Inhalation und Bestimmung wurden bei jeder Gelegenheit dreimal wiederholt.

Tab. 3.

*Einfluss von Amylnitrit auf die Vitalkapazität bei blutleeren Beinen.*

Ver- suchs- person	Datum	Vitalkapazität in l			Differenz in l	
		blutl. Beine I	nach Inh. v. Amylnitr. II	blutgef. Beine III	I—II	I—III
G-t	6.6.	4.36	4.59	4.51	0.160	0.110
		4.48	4.56	5.55		
		$M = \frac{4.42}{}$	$M = \frac{4.59}{}$	$M = \frac{4.52}{}$		
G-t	7.6.	4.47	4.66	4.54	0.170	0.090
		4.56	4.68	4.66		
		$M = \frac{4.51}{}$	$M = \frac{4.68}{}$	$M = \frac{4.60}{}$		
G-t	10.6.	4.44	4.56	4.77	0.180	0.390
		4.30	4.64	4.83		
		$M = \frac{4.52}{}$	$M = \frac{4.60}{}$	$M = \frac{4.82}{}$		
W-d	20.9.	4.19	4.38	4.74	0.230	0.550
		4.21	4.46	4.73		
		$M = \frac{4.16}{}$	$M = \frac{4.42}{}$	$M = \frac{4.76}{}$		

Wie aus Tab. 3 hervorgeht nimmt die Vitalkapazität bei Inhalation von Amylnitrit zu. Bei Blutverschiebungen höheren Grades beträgt die Vitalkapazitätssteigerung etwa die Hälfte derjenigen Variation, welche sich hydrostatisch hervorrufen lässt. Bei dem Versuch an W—d wurde Amylnitrit auch bei blutgefüllten Beinen inhaliert. Dabei betrug die Vitalkapazität bei drei Bestimmungen im Mittel 4.69 l, woraus ersichtlich wird, dass der Effekt von dem Vorhandensein des im Thorax angesammelten Blutes abhängig ist.

*Vasopressin.* Die Bestimmung der Vitalkapazität wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach intramuskulärer Injektion von 0.7—1.2 ml Pitressin (P. D. u. Co.) vorgenommen. Die erste Bestimmung wurde ausgeführt, sobald Erblässen und gleichzeitig eine Blutdrucksteigerung von etwa 10 % eintrat. An demselben Zeitpunkt — in der Regel 8—10 Minuten nach der Injektion — pflegte auch die Versuchsperson kolikartige Empfindungen im

Tab. 4.  
Einfluss von Vasopressin auf Vitalkapazität, Pulsfrequenz und Blutdruck.

Ver- suchs- person	Datum	Vit.-kap. in l stehend	Vitalkapazität in l, Pulsfrequenz, Blutdruck in mm Hg						Vit.-kap. in l blutgef. Beine		
			blutleere Beine			Nach Injektion von Vasopressin					
			5—15 Min.			15—30 Min.					
			Vit.-kap.	Puls	Blutdr.	Vit.-k.	Puls	Blutdr.		Vit.-k.	Puls
G-t	11.1.	4.46	56	125/85	4.12	72	135/90	4.30	70	130/90	4.38
		4.54			4.12						4.41
		$\frac{4.42}{M = 4.47}$			$\frac{4.18}{M = 4.14}$				$\frac{4.29}{M = 4.29}$		
G-t	24.1.	4.44	62	115/75	3.99	76	127/80	4.31			4.32
		4.49			4.02						4.29
		$\frac{4.49}{M = 4.47}$			$\frac{4.02}{M = 4.00}$				$\frac{4.36}{M = 4.33}$	82	120/80
W-d	31.1.	4.31	52	100/70	3.98	48	100/70	3.92	60	110/75	4.00
		4.25			3.96						3.91
		$\frac{4.25}{M = 4.29}$			$\frac{3.97}{M = 3.98}$				3.88		
W-d	7.2.	4.36	56	123/75	3.99	74	130/80	4.10	84	137/85	4.03
		4.28			4.08						3.97
		$\frac{4.31}{M = 4.32}$			$\frac{4.06}{M = 4.01}$				$\frac{4.03}{M = 4.06}$		

Leibe zu verspüren. Bestimmungen wurden ausgeführt in gewöhnlicher aufrechter Haltung, in liegender Stellung bei blutleeren Beinen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion sowie bei blutgefüllten Beinen ca. 1½ Stunden nach derselben (Tab. 4). Ausserdem ist in dieser Tabelle die Pulsfrequenz sowie der systolische und diastolische Blutdruck vor und nach der Vasopressininjektion angegeben.

Es ergibt sich aus diesen Bestimmungen, dass Vasopressin nicht die Vitalkapazität in Zusammenhang mit der Blutdrucksteigerung beeinflusst. Bei G—t nahm zwar die Vitalkapazität 15—25 Minuten nach der Injektion zu; dies ist aber nach dem Zeitpunkt, wo der Blutdruck den Höhepunkt erreicht hat. G—t empfand da auch heftige Kolikschmerzen, so dass er nur mit Mühe stillhalten konnte. Es ist daher möglich, dass die später eintretende Zunahme der Vitalkapazität bei G—t nur sekundär mit der Vasopressinwirkung zusammenhängt. Bei W—d änderte sich dagegen die Vitalkapazität nicht, wenigstens nicht in den nächsten 40 Minuten nach der Injektion.

Diese Versuche haben auch gezeigt, dass im Zusammenhang mit veränderten hydrostatischen Verhältnissen auch ziemlich lange nach der Injektion keine oder nur unerhebliche Blutverschiebungen zustande kommen. So änderte sich die Vitalkapazität bei den folgenden Versuchen mit passiver Hängelage während 15—20 Minuten nicht, obgleich dieselben ca. 1½ Stunden nach der Injektion vorgenommen wurden. Bei drei Versucher war somit die Vitalkapazität nach Blutfüllung der Beine ganz dieselbe wie in liegender Stellung. Man vergleiche auch die Vitalkapazität nach passiver Hängelage mit der in gewöhnlicher aufrechter Haltung vor der Injektion! Bei sämtlichen Versuchen ist die Vitalkapazität kleiner, bei dreien wesentlich kleiner, als im letzteren Falle. Es ergab sich auch, dass Vasopressin noch lange nach der Rückkehr des Blutdrucks auf das normale Niveau eine gefässtonisierende Wirkung entfaltet. Es scheint daraus auch hervorzugehen, dass die Wirkung des Vasopressins in erster Linie in einem tonisierenden Einfluss auf die Blutgefässe besteht, wodurch u. a. hydrostatisch bedingte Blutverschiebungen verhindert werden.

Vasopressin scheint also nicht direkt entleerend auf das in den Lungen angesammelte Blut und damit nicht kontrahierend auf die Blutgefässe zu wirken, welche jenes Blut aufgenommen hatten. Das Hormon verhindert wahrscheinlich durch seine all-



## Einfluss von Adrenalin und Ephedrin auf die Vitalkapazität

Ver- suchs- person	Datum	Injektion	V i t a l k a p a -			
			b l u t l e e r e B e i n e			
			vor d. Inj. I	5—10	11—15	16—20
			Min. n. d. Inj. II			
G-t	23.11.	Ephedr.	4.42	4.46	4.50	
			4.86			
			4.42			
			M = 4.40			
G-t	25.11.	Ephedr.	4.84		4.56	4.69
			4.48			
			4.44			
			M = 4.40			
G-t	3.4.	Adren.	4.45	4.45	4.67	4.66
			4.50			
			4.40			
			M = 4.45	M = 4.55		
W-d	12.10.	Ephedr.	4.05	4.24	4.60	4.75
			4.12			
			4.28			
			M = 4.15	M = 4.64	M = 4.78	
W-d	26.10.	Ephedr.	4.86	4.80	4.22	4.45
			4.36			
			4.35			
			M = 4.37			
W-d	27.11.	Ephedr.	3.99	4.23	4.44	4.52
			4.00			
			4.03			
			M = 4.01			
W-d	28.2.	Adren.	4.09	4.05	4.17	
			4.03			
			4.11			
			M = 4.08	M = 4.05	M = 4.15	

gemein gefässtonisierende Wirkung die Entleerung des deponierten Blutes bei einer folgenden Änderung der hydrostatischen Verhältnisse.

*Adrenalin und Ephedrin.* Aus Tab. 5 geht hervor, dass eine subkutane Injektion von Adrenalin (1 mg) oder Ephedrin (50 mg) die Vitalkapazität steigert, nachdem Blut aus den unteren Extremitäten entleert worden war. Diese Zunahme findet

5.

bei verschiedenen Blutmengen in den unteren Extremitäten.

z i t ä t i n l				Differenz	
blutgefüllte Beine				I—II	I—III
21—30	vor d. Inj. III	5—15	16—25		
		Min. n. d. Inj. IV			
4.57	4.86				
	4.78			0.200	0.410
4.64	4.80				
M = 4.60	M = 4.81				
	4.77		4.86		
4.67	4.75	4.76		0.280	0.360
	4.75		4.81		
	M = 4.76		M = 4.83		
	4.62			0.220	0.210
	4.66				
	4.69				
	M = 4.66				
	4.68	4.79	4.75		
	4.76		4.67	0.580	0.580
	4.74	4.71	4.77		
	M = 4.73	M = 4.75	M = 4.78		
4.48	4.65	4.58	4.71		
4.51			4.69	0.120	0.260
4.49	4.61	4.73	4.66		
M = 4.49	M = 4.63	M = 4.65	M = 4.69		
4.59	4.54	4.59			
	4.37		4.60	0.520	0.460
4.48	4.51	4.61			
M = 4.53	M = 4.47	M = 4.60			
4.44	4.54	4.49	4.44		
	4.51			0.370	0.450
4.47	4.54	4.48	4.56		
M = 4.45	M = 4.53	M = 4.48	M = 4.50		

stufenweise statt, ist oft schon nach 5—10 Minuten angedeutet und scheint 15—20 Minuten nach der Injektion ihren Höhepunkt zu erreichen. Bei einigen Versuchen entspricht die Vitalkapazität nach der Injektion der bei blutgefüllten Beinen, also nach 15—20 Minuten passiver Hängelage mit abwärtsgerichteten Beinen. Bei anderen Versuchen ist der Effekt des Adrenalins oder Ephedrins geringer. Dies lässt sich dadurch erklären, dass

die Resorptionsbedingungen bei den einzelnen Versuchen verschieden waren. Auch die Wirkung auf Blutdruck und Pulsfrequenz ist bei denjenigen Versuchen eine ausgesprochenere, wo die Vitalkapazitätsänderung grösser ist.

Bei blutgefüllten Beinen und von vornherein schon grosser Vitalkapazität haben Adrenalin und Ephedrin entweder gar keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Vitalkapazität. Es macht also den Eindruck, als ob Adrenalin und Ephedrin

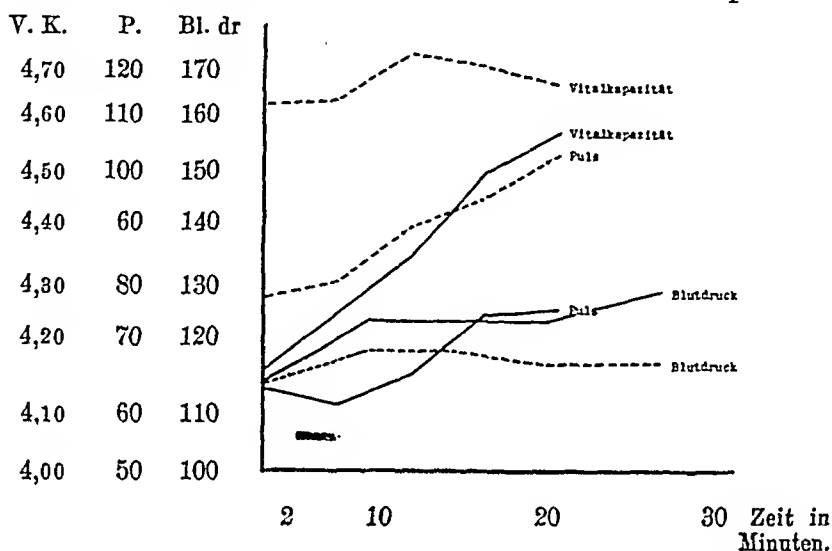


Abb. 1. Einfluss von Ephedrin auf Vitalkapazität, Blutdruck und Pulsfrequenz bei blutleeren (ausgezogene Linien) und blutgefüllten Beinen (gestrichelte Linien). Angegeben sind mittlere Werte aus 3 Versuchen an der Versuchsperson W—d.

unter diesen Versuchsbedingungen die Entleerung von Blut aus dem Thorax auf dieselbe Weise bewirken wie bei Änderung der hydrostatischen Verhältnisse, und dass dieselben, wenn die in beiden Fällen sozusagen zur Verfügung stehende Blutmenge bereits erschöpft ist, keine Wirkung entfalten.

Es war von Interesse, den Einfluss des Ephedrins auf Pulsfrequenz und Blutdruck in den beiden Fällen mit und ohne gleichzeitige Entleerung von Blut aus dem Thorax zu vergleichen. In Abb. 1 ist die Beziehung zwischen Vitalkapazität, Pulsfrequenz und Blutdruck bei den Ephedrinversuchen an W—d graphisch dargestellt. Dieselbe Beziehung zwischen Pulsfrequenz und Vitalkapazität nach Injektion von Ephedrin wurde bei G—t bei dem Versuch am 25. 11. gefunden, dem einzigen Versuch an ihm, wo während des ganzen Experiments die Pulsfrequenz festgestellt wurde. Aus diesen Versuchen geht mit aller Deutlichkeit her-

vor, dass Ephedrin bei blutgefüllten Beinen in sehr hohem Grade pulsbeschleunigend wirkt, und zwar, wenn nicht gleichzeitig Blut aus dem Thorax entleert wird. Dagegen scheint der blutdrucksteigernde Effekt, dem Versuch an W—d nach zu urteilen, bei gleichzeitiger Entleerung von Blut aus dem Thorax stärker zu sein. Dies lässt sich selbstverständlich dadurch in befriedigender Weise erklären, dass die Blutdrucksteigerung in diesem Falle auf dem Wege über die pressoregulatorischen Rezeptororgane eine Stimulierung des Vaguszentrums und damit eine Herabsetzung der Herzfrequenz auslöst.

SCHULTEN, BUDELMANN und LIPPELT (1933) geben an, dass Adrenalin die Vitalkapazität verkleinert, und zwar kann die Abnahme bei Personen in gewöhnlicher liegender Stellung mehrere hundert ml betragen. Die Versuche, über welche hier berichtet wird, bestätigen diese Behauptung nicht, und auch weitere Experimente bei gewöhnlicher liegender Stellung ohne Abschnürung der Beine lieferten mit den Ergebnissen dieser Forscher keineswegs übereinstimmende Resultate, wenn sich auch ein entleerender Effekt dabei nicht sicher nachweisen liess.

Die vorgenommene Analyse mittels gefässbeeinflussender Pharmaka hat also ergeben, dass sowohl das gefässdilatierende Amylnitrit wie das Adrenalin auf das in die Lungen aufgenommene Blut entleerend wirkt, während das gefässkontrahierende Vasopressin diesen Effekt nicht besitzt. Dies zeigt, dass die Entleerung nicht lediglich den Gesetzen des Gefässtonus folgt. Die entleerende Wirkung des Amylnitrits dürfte mit dem blutdrucksenkenden Effekt des Medikaments zusammenhängen. Man kann annehmen, dass dabei dieselben regulierenden Faktoren beteiligt sind, wie bei Blutdrucksenkung als Folge eines verminderten Zustroms zum Herzen, wie beim Übergang von liegender zu aufrechter Haltung und bei der Absperrung grösserer Blutmengen in den unteren Extremitäten. Der Unterschied zwischen der hydrostatisch bedingten Blutansammlung in den Beinen bei aufrechter Körperhaltung und der Aufnahme von Blut im Thorax geht aus der verschiedenen Einwirkung des Vasopressins auf diese beiden Formen von Blutansammlung hervor.

Es kann hier erwähnt werden, dass die Wirkung wenigstens des Adrenalins und Vasopressins mit dem Effekt dieser Medikamente auf die Milz übereinstimmt. Adrenalin bringt die Milzkapsel zur Kontraktion, während Vasopressin zwar bis zu einem gewissen Grade verkleinernd auf das Milzvolumen wirkt, aber

nicht durch einen kontrahierenden Effekt auf die Milzkapsel, sondern durch eine direkte Beeinflussung der Blutgefässe. Es hemmt somit in erster Linie die Blutzirkulation durch die Milz (DE BOER und CARROLL, 1925).

### Erörterung der Versuchsergebnisse.

Die einleitend angeführten Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Grösse der Vital- und Totalkapazität entsprechend der Blutmenge in den unteren Extremitäten wechselt, und dass diese Schwankungen von Blutmengenvariationen in den Lungen bedingt werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde über Untersuchungen berichtet, welche ergaben, dass sowohl bei gewöhnlicher liegender wie bei aufrechter Haltung erhebliche Blutmengen aus den Lungen entleert werden können, und dass die Variationen der im Brustkorb angesammelten Blutmenge dabei gänzlich oder zum grösseren Teil den Veränderungen der Blutmenge in den unteren Extremitäten entsprechen. Die Analyse der Wirkung von Amylnitrit, Vasopressin, Adrenalin und Ephedrin auf die Vitalkapazität bei Entleerung von Blut aus den Beinen hat gezeigt, dass dabei das Blut aus dem Thorax gemäss der Anforderung des Kreislaufs abgegeben wird, wie bei Senkung des Blutdrucks (Amylnitrit) oder bei Steigerung des Minutenvolumens und der zirkulierenden Blutmenge (Adrenalin und Ephedrin). Dagegen wird die Thoraxblutmenge bei einer allgemeineren Gefässkontraktion ohne Zunahme des Minutenvolumens, wie unter dem Einfluss von Vasopressin, nicht herabgesetzt.

Die auf diese Weise gemachten Beobachtungen stehen offenbar im Einklang mit der Anschauung, dass die Lungen als Blutdepot eine gewisse Rolle spielen. Da Blutmengen von mehreren hundert ml aus den unteren Extremitäten entleert werden können und eine nahezu exakt entsprechende Abnahme der Vitalkapazität gleichzeitig erfolgt, scheinen die Lungen auch beim Menschen das einzige wesentlichere Blutdepot zu sein, welches bei derartigen Blutmengenvariationen in Funktion tritt. Alle anderen Organe, welchen von verschiedenen Forschern als Blutdepots Bedeutung beigemessen wird, scheinen also beim Menschen auch bei erheblichen Blutverschiebungen zu und von den unteren Extremitäten keine nennenswerten Blutmengen aufzunehmen. Dies stimmt mit den Ergebnissen früher angestellter Versuche an

Tieren mit Fixierung der Blutverteilung in den peripheren Blutgefässen bei einem plötzlichen Tode ohne vorausgehende Betäubung und Operation der Tiere überein.

Mann kann sich nicht denken, dass die Entleerung von Blut aus den Lungen bei einer Änderung der hydrostatischen Verhältnisse gelegentlich einer Gefässdilatation mit Sinken des Blutdrucks oder unter dem Einfluss von Adrenalin eine nachteilige Wirkung auf die Ernährung des Lungengewebes oder auf die Funktion der Lunge als Atmungsorgan ausübt, da diese, wenigstens bei gleichzeitiger Einwirkung von Adrenalin und Ephedrin, gesteigert ist. Die Aufnahme und Abgabe dieses Blutes in den Lungen entspricht also in dieser Hinsicht den Verhältnissen in einem echten Blutdepot. Es ist nicht nachgewiesen worden, dass sich dieses Blut in langsamer Zirkulation befindet, wie in der Milz, aber unter dem Gesichtspunkt der Funktion kann das nicht von grösserer Bedeutung sein. Bei Tieren in gewöhnlicher Aktivität befindet sich das in den Lungen angesammelte Blut in verhältnismässig langsamer Zirkulation, wie Versuche mit Injektion von Farbstoff gezeigt haben (T. SJÖSTRAND, 1934, 1935).

Die vorliegenden Untersuchungen stützen demnach fernerhin die Theorie, dass bei Säugetieren die Lungen als ein wichtiges Blutdepotorgan fungieren.

### Zusammenfassung.

Bei einer Vermehrung der Blutmenge in den unteren Extremitäten durch Absperrung der Blutzirkulation in diesen nach Einnehmen von passiver Hängelage während 15—20 Minuten nimmt die Vitalkapazität, sowohl bei aufrechter wie liegender Stellung bestimmt, zu. Bei Entleerung von Blut aus den Beinen durch Einnehmen von passiver Hängelage mit abwärtsgerichtetem Kopf während 5—10 Minuten vor der Absperrung des Blutstroms nach den Beinen nimmt die Vitalkapazität ab. Die Änderungen der Vitalkapazität stimmen im grossen ganzen mit den Variationen des Beinvolumens überein.

Bei liegender Stellung mit »blutleeren« Beinen lässt sich eine Zunahme der Vitalkapazität durch Adrenalin, Ephedrin und Amylnitrit erzielen. Dagegen übt Vasopressin unter diesen Umständen keine sichere Wirkung auf die Vitalkapazität aus.

Die Untersuchungen machen also ersichtlich, dass sich bei

Änderung der Blutfüllung in den unteren Extremitäten die Blutmenge im Thorax in entsprechendem Grade ändert, und dass sowohl eine Senkung des arteriellen Blutdrucks durch eine Gefässdilatation wie eine Steigerung desselben mit gleichzeitiger Zunahme auch des Minutenvolumens und der zirkulierenden Blutmenge die Entleerung von Blut aus dem Thorax veranlassen kann, vermutlich ohne dass dadurch die nutritive Blutversorgung der dort befindlichen Organen eingeschränkt würde. Dieses Verhalten spricht dafür, dass die Lungen beim Menschen, ebenso wie bei anderen Säugetieren, eine Art von Blutdepotfunktion haben.

#### Literaturverzeichnis.

- ASMUSSEN, E., E. HOHWÜ CHRISTENSEN und M. NIELSEN, Skand. Arch. Physiol., 1939, *81*, 204.
- ASMUSSEN, E., E. HOHWÜ CHRISTENSEN und T. SJÖSTRAND, Ebenda, 1939, *82*, 193.
- BUDELMANN, G., Klin. Wschr., 1937, *16*, 704, 1270, 1711.
- DE BOER, S., und D. S. CARROLL, J. Physiol., 1925, *59*, 381.
- HAMILTON, W. F. und A. B. MORGAN, Amer. J. Physiol., 1931, *99*, 526.
- HOCHREIN, M. und J. KELLER, J. Arch. exp. Path. Pharmak. 1932, *164*, 529.
- , Ebenda, 1932, *166*, 229.
- , Klin. Wschr., 1932, *11*, 231, 1574.
- JONSELL, S. und T. SJÖSTRAND, Acta physiol. scand., 1941.
- SCHULTEN, H., G. BUDELMANN und H. LIPPELT, Klin. Wschr., 1933, *12*, 1017.
- SJÖSTRAND, F. und T. SJÖSTRAND, Anat. Anz., 1938, *87*, 193.
- SJÖSTRAND, T., Klin. Wschr., 1934, *13*, 169.
- , Skand. Arch. Physiol., 1935, *71*, Suppl.
-

From the Biological-Chemical Laboratories Medicinalco Ltd.  
Copenhagen. S.

# A Method of Determining the Quantity of Heat Evolved on the Complex Resistance in an Element of the Blood-Flowmeter ("Thermo-Stromuhr") after Rein.<sup>1</sup>

(The Pedersen Principle Applied in the Rein Thermo-Stromuhr.)

By

I. K. TVEDE-JACOBSEN.

---

Rein's flow meter ("Die Thermo-Stromuhr") (1928), (1929) is an apparatus which makes it possible to obtain a continuous record of the mean minute-volume of blood flowing in an unopened vessel.

The principle of the measuring arrangement is to supply a cross section of the vessel with a steady and measurable flow of heat. Hereby the temperature of blood is raised presumably in inverse ratio to its velocity. The difference in blood temperature before and after the heated section is therefore taken to be an expression of the minute-volume. The blood temperatures cannot be measured directly but by means of the laws of heat convection certain conclusions about the blood temperatures and accordingly the minute-volume can be drawn from the surface temperatures of the vessel-walls.

According to REIN the heating of the cross section of the vessel must be brought about by means of high frequency alternating current which is conveyed to the cross section of the vessel through electrode plates on its walls. The surface temperatures are measured by means of thermo junctions connected to galvanometers. Heating electrodes and thermo junctions are usually built into u-shaped cuvetts to units fitting round the blood vessel.

<sup>1</sup> Received 28 April 1941.



Such a unit is here defined as a Rein-element.

Ever since the time when this Thermostromuhr became known, a constant discussion has been going on as to whether this instrument could be used quantitatively or not. The continual appearance of new proposals (SCHMIDT & WALKER, 1935—39, BALDES & HERRICK 1937, KOLIN 1936) to alter the original embodiment of the principle given by REIN as well as the prevailing tendency to be content with purely qualitative results appears to show that the use of the apparatus in practice still offers certain difficulties to the users.

Several authors have examined and described the sources of error in thermo-stromuhr measurements. Among the contributions of practical importance might be mentioned BARCROFT and LOUGHRIDGE's 1938 investigations on the influence of variations in the blood temperature. More theoretically interesting are A. C. BURTON's 1938 examinations of the manner in which the direct heat convection from the heated cross-section in a Rein-element, respectively with and against the blood flow, especially for low flow velocities may influence the shape of the adjusting curves of the element.

It must probably still be answered in the negative whether quantitative work with the stromuhr can be performed in *such* a sense that it should be possible to calculate the limit of error of the final result from the known limits of error of the measurements and observations forming the basis of the latter.

When the method given by REIN is strictly adhered to the basis for such an error calculation for the result of an experiment must in fact be:

- I. A determination of the limit of error for the measurement of the quantity of heat evolved per unit of time in a Rein-element.
- II. A determination of limits of error in the model verification of an element described by REIN, and finally
- III. A judgment as to whether the requirements in respect to the object experimented upon and the surrounding conditions forming the basis for REIN's theory have been filled (viz. such assumptions as: constant external temperature conditions, a uniform heating throughout the entire cross-section of the blood vessel, no velocity gradient for the flow in the cross-section, no turbulence etc.).

The method of verification mentioned under II is a direct one. A piece of bloodvessel is placed in a Rein-element protected against thermal radiation and convection. Through the bloodvessel is directed blood or a liquid having as far as possible the chemical and physical properties of blood — especially in respect to conductivity, heat capacity, and viscosity. The Rein-element is connected to a generator and a thermo-galvanometer in the usual way after which, for a fixed

heat effect the galvanometer deflections and the corresponding velocities of the blood flow e. g. measured by means of a measuring cylinder and a stop watch are plotted against each other.

Anybody having tried to perform such verifications will know, how difficult it is to perform such measurements in a reliable manner. A series of apparently well-defined points of a verification curve may as a rule easily be plotted by a single quickly performed experiment, but the difficulties appear, when it is attempted to reproduce, by a new experimental arrangement, the curve thus found. The new curve can have a shape deviating considerably from the former one and its position relatively to the co-ordinate axes can be more or less displaced. The main reason for this must be sought in the fact that it is extremely difficult, under such conditions, to maintain sufficiently constant temperature conditions around the Rein-element. Even very small differences in respect to the conditions of heat convection and radiation between the thermojunctions and the surroundings, will cause slow displacements of the initial point of the thermo-galvanometer and, consequently, the said inconvenience will appear.

While the difficulties in stromuhr measurements mentioned under II and III are mostly of a purely practical nature, the measurement of the quantity of heat evolved in an element as mentioned under I certainly has caused the greatest theoretical difficulties. The original method of measurement given by REIN is to measure 1) the effective value of the heating current produced by the generator and flowing through the element, and 2) the "resistance" of the element (the cross-section of the blood vessel) and, on the basis thereof, to calculate the quantity of heat evolved according to JOULE's law. According to REIN, the measurement of the heating current intensity is effected in a thermo-coupled milliamperemeter inserted in the circuit, while the resistance is measured by substitution with a purely ohmic resistance.

For the following theoretical and practical reasons, however, this method is insufficient and rather unsuitable: 1) The losscausing resistance in the element is not purely ohmic, but may be considered to be ohmic resistances shunted with small capacities, in such a manner that the current flowing in the element is phase-displaced, while also larger or smaller dielectric losses occur. The substitution resistance found by the above mentioned method will consequently indicate the impedance and not the effective resistance proper, in the following called the "loss resistance". 2) Even if the resistance thus found had been the real loss resistance, the accuracy of the measurement would be small, for the following reasons: Quite indepently of its manner of coupling, every valve generator has a pronounced tendency to adjust its effective terminal voltage according to its load, in such a manner that, at a certain adjustment of the tuning of the outlet circuit, it will tend to maintain constant the energy given off. Relatively greater changes in the load resistance will give relatively smaller changes in the current through the load. More accurate results would be obtained, if the determination of the element resistance were performed

by means of a two-branch arrangement, as outlined in Fig. 1, with two thermo-instruments and a certain known ohmic resistance, as the terminal voltage would here remain constant, and the impedance in the element and resistance would be inversely proportional to the two current intensities measured. Such an arrangement, however,

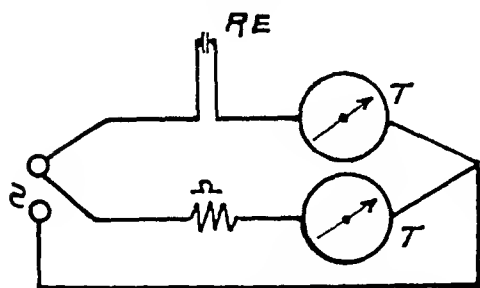


Fig. 1. Wiring diagram for impedance measurement for Rein-elements.

RE = Rein element, T = thermo-coupled instruments.

self unsuited for use in experiments on animals, as the instruments operate with a time-lag and their time of adjustment is long and sometimes uncertain.

In our laboratory we have used, for the mentioned reasons, as a supplement to Rein's method, an *indirect* method which, as appearing from the following detailed description, 1) permits a quick, secure, and accurate measurement of the quantity of heat evolved and 2) thus opens a possibility for an easier and more reliable quantitative interpretation of the registered blood flow curves than has been possible heretofore.

The method is described and named "Diawatt" method by GUNNAR PEDERSEN and originally used in diathermic apparatuses for therapeutical use. It is based on the circumstance that a close connection consists between the internal functions of a generator valve and the high-frequency energy given off. Thus the direct current from anode to cathode will increase when the load increases, while the current from the controlling grid to the cathode (if the valve operates with grid current) will decrease when the load increases. These facts may be utilized for a practical apparatus for output measurement, which in principle may be constructed as shown in Fig. 2.

In the grid and anode circuit of the valve, resistances are inserted which are constructed as potentiometers the contact arms of which are connected to a moving-coil instrument. By

would be impracticable in experiments on animals. (It is certainly possible by means of various arrangements for compensation of the phase-displacement, to perform fully correct determinations of the loss resistance in complex loads but for practical reasons the performance of such measurements in parallel to stromuhr measurements is not to be considered).

3) Every measurement method based on the use of thermo-coupled instruments is by it-

adjustment of the contact arms, a position is found in which the instrument shows zero when the generator swings without external load. When the valve is loaded, the instrument will make a deflection determined by the difference in voltage between the contact arms and this deflection will vary very nearly rectilinearly with the Watt delivery from the valve. The verification is effected easily by means of induction-free and capacity-free load resistances and a thermo-coupled milliamperemeter. *Under certain conditions this adjustment will be valid also for loads that do not have a purely ohmic character.*

The measurements, however, may also be performed solely by anode-current variations or solely by grid-current variations. A measuring device operating solely with anode current which is now in use in our laboratory, and distinguishes itself by its great simplicity will be described in the following.

The measuring apparatus is used here in connection with a universal valve of the "CL"-type, but with slight modifications it may easily be connected to any stromuhr generator.

As shown in Fig. 3, there is inserted, in the anode circuit of the valve, an ordinary moving-coil milliamperemeter MA with a low internal resistance and with a scale radius of about 4 inches. The instrument is fitted a "series" shunt, in such a manner that the full deflection, equal to 200 divisions, corresponds to 2 MA, 10 MA, and 50 MA, respectively. Parallel to the series shunt, a compensation circuit is now disposed, consisting of a 1.5 volt dry-cell DC, a regulating resistance  $R_1$  of 400  $\Omega$ , out of which about 100  $\Omega$  are fixed as a safety resistance for the measuring instrument, a feeble-current regulating resistance  $R_2$  of about 20  $\Omega$  and a switch S. The entire measuring circuit is uncoupled for high-frequency current by means of a condenser C of about 0.1 MF. The measuring apparatus is used as follows: The generator

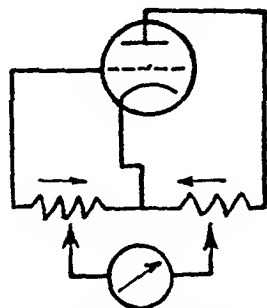


Fig. 2. Diagram showing the principle of Diawatt-measurement.

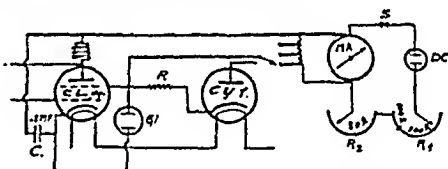


Fig. 3. Example of a Diawatt measuring device with a foreign source of current for compensation of the no-load anode current.

$G_1$  = glim lamp.  $R$  = ohmic resistance. MA = moving-coil milliamperemeter. DC = dry cell. S = switch.

is started without load, and when after some time the no-load anode current is constant, the switch  $S$  is closed, after which the instrument is caused to show zero by an adjustment of  $R_1$  and  $R_2$ . A few points of an adjusting curve may now easily be plotted

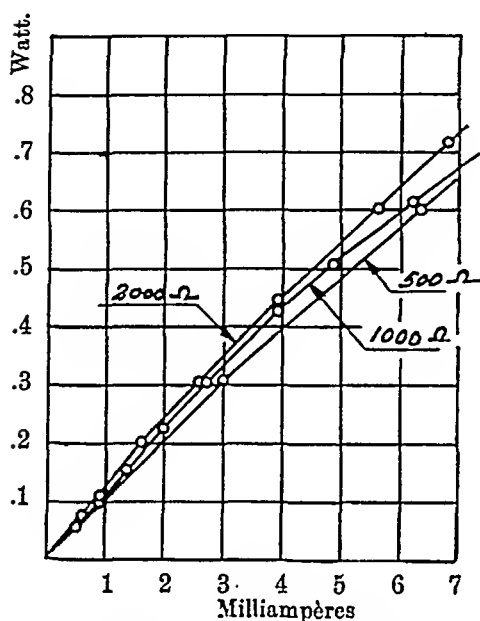


Fig. 4. Example of a Diawatt adjustment.

accuracy is about  $\frac{1}{5}$  of a division, and in which the tolerance of measurement is about 1 %, at full deflection, and by a suitable selection of the range of sensitiveness to be used under all conditions occurring in stromuhr experiments, a limit of errors amounting to at most 2 % may be maintained.

It should be mentioned at once, however, that the adjusting curves to a small extent depend on the order of magnitude of the load, but if a set of curves for the range between for instance 500 and 2,000  $\Omega$  are recorded, it is seen that if merely the loss resistance is known with an accuracy of 100 to 200  $\Omega$ , it will be possible, by means of an interpolation, to remain within of the said error limit of 2 %. Besides, the variation of the adjusting curves certainly depends largely on the impedance adjustment between the valve generator and the tuning elements of the oscillation circuits. By a suitable selection of these values, the variation may possibly be considerably diminished.

An adjustment of the high-frequency energy with the above mentioned accuracy is of course contingent on the generator

by means of purely ohmic resistances and a thermo-instrument. The curve thus plotted appears to be very nearly rectilinear, but is in fact faintly curved, with the convex side facing upward in the system of co-ordinate axes, see Fig. 4.

The accuracy of this measuring method is exceedingly great and is practically equivalent to the accuracy with which the current intensity can be measured on the moving-coil instrument used. By means of an instrument like the one just mentioned in which the absolute reading

being stable in its function. It is absolutely necessary that the apparatus should be encased in a metal box that is earthed, and similarly all the coupling elements and the coupling conditions should be constant, in order that an adjustment once made may remain valid. If, however, adjustable couplings are used, for instance between the anode circuit and the outlet circuit, these must be adjusted to the point where the no-load anode current is the same as originally since a certain no-load current corresponds to a certain ratio of coupling.

The measuring apparatus described here offers an opportunity to unveil various sources of error in stromuhr measurements that heretofore have perhaps been unnoticed. If the generator is driven directly from the lighting net as the commercially manufactured generators generally are, it is seen what a considerable influence on the effect is exerted by the rapid voltage variations always occurring, even in a well balanced lighting net. The effect of a generator is nearly proportional to the square of the anode voltage. If the voltage e. g. varies rapidly between 220 and 210 volts, the ratio of the corresponding effects will be  $220^2/210^2$ , i. e. about 9 % variation. Since the thermo-voltages vary at the same rate as the effect, the voltage variation will thus produce an undesired galvanometer deflection amounting to 9 % of the initial deflection, which may perhaps be equal to, or greater than, those produced by the blood-flow variations. It is reasonable to expect that the saw-like appearance frequently offered by a blood-flow curve is in many cases merely due to net-voltage variations. This source of error is not at all unveiled by the thermo-instrument inserted in the outlet circuit of the generator, but will manifest itself plainly on the slightly damped moving-coil instrument used in our measuring apparatus. The effect of the net-voltage variation may, however, be removed entirely by the voltage-variation equalizer indicated in the sketch and consisting of the glimlamp G1 plus series resistance R. In order to function correctly, the lamp as well as the resistance must of course be adjusted accurately to the requirements of the oscillator valve.

The central feature of the measuring method is consequently 1) that by various stabilizing arrangements the result is secured that the no-load consumption of the generator will remain perfectly constant 2) that by a suitable bridge arrangement the no-load current is compensated for, so that variations in the anode current can be measured on a direct-current instrument *the sensitivity of which can now be adjusted according to the accuracy with which it is desired to measure.*

The no-load current is certainly to a great extent dependent on the internal loss in the generator. In order to render these losses as

well defined as possible, the outlet circuit of the generator should be constructed in such a manner that the circuit is entirely broken in the case of no-load. This happens with the coil, tuning condenser and external load in series, as shown in Fig. 5 a and not in parallel as shown in Fig. 5 b as sometimes done. As the load resistance, in

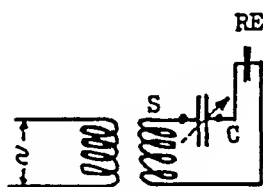


Fig. 5 a.

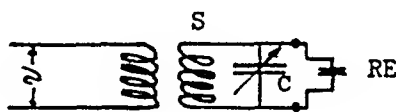


Fig. 5 b.

Fig. 5. Wiring diagrams for the coupling of Rein-Elements in the outlet circuit.

RE = Rein-Elements.

the first mentioned case, dampens the oscillation circuit greatly, when it has high values, the impedances of S and C should be adjusted in such a manner that the generator has a suitable high degree of efficiency, when the external load has an order of magnitude of from 1,600 to 400  $\Omega$ , corresponding nearly to one to four elements in parallel<sup>1</sup>. If the last mentioned manner of coupling was used, the efficiency would be highest for a large external load, and more elements had then to be coupled in series.

The incontestable advantages of the method are pointed out above, but it might perhaps appear to be a bold assertion to maintain that the method is infallible, or that there may not exist sources of error that have been overlooked. Thus the objection may be set forth that what is measured is the external losses of the generator, but that these losses are not guaranteed to be covered entirely by the heat evolved in the element, as for instance radiation losses might be included in the losses measured. The answer to this will be that the adjustment curves plotted for the wattmeter have always proved to be perfectly reproduceable under conditions where the aim has been to give favorable conditions for radiation losses (long wires, high effective voltages etc.) as well as under conditions where the aim has been to limit such losses. Another and more important objection is the following: The heat measured at the adjustment is measured as JOULE's heat, as it has been delivered to, and measured on, purely ohmic resistances. The question may be made whether the adjustment thus gained will remain valid, when the load resistance also includes capacities or other alternating-current resistances. To this question the following answer may be given: According to GILDEMEISTER and others (1928), the complex resistance in a piece of organic tissue (in casu the blood vessel enclosed in the cuvette of the Rein-element) is considered to be composed of a purely ohmic resistance R, a portion of which is shunted

<sup>1</sup> The loss resistance for an element of the size mostly used (2 to 3 mm diameter) is as a rule from 1,200 to 1,500  $\Omega$ .

with a loss-free condenser C (which in its turn may be considered to be a combination of electrostatic capacities and electrolytic polarization capacities). The position of this complex resistance in the outlet circuit, however, as shown in Fig. 5 a is such that it enters in series with the tuning elements of the circuit. These elements are by themselves forming a complex load. A modification, within relatively wide limits, of the values and adjustment of the latter in a model apparatus according to Fig. 5 a, however, is shown by experience to have no appreciable influence on the adjustment curves. It must therefore be considered to be proved that *under the existing conditions the adjustment remains valid also for loads of a not purely ohmic character.*

A third question which in this connection might naturally be asked, is whether other electro-energetic processes are going on in the load resistance than the presumed conversion of current energy into heat, although this has no direct connection to the use of the loss-determination method described here or, alternatively, the original method. According to GILDEMEISTER, the capacity contained in the complex resistance must be considered to be mainly due to electrolytic polarization. It might then be possible that the electro-chemical processes causing this polarization might be of a heat-binding character. The answer to this must presently be postponed, but it is probable that heat phenomena of this nature, at any rate, are so small that they are irrelevant in this connection.

The circumstance that the measuring method described here and referred to as "Diawatt" permits a speedy and easy tolerance measurement of the quantity of heat delivered to the Reinelement opens now also the possibility of an indirect quantitative interpretation of the resulting blood-current curves. The measurement of minute-volumes are in fact, besides by the above mentioned quantity of heat, determined by the galvanometer deflections. The latter, in their turn, are an expression for, and are directly proportional to, the temperature difference between the soldering points of the thermo-junctions and thus between the surface temperatures of the vessel wall, before and after the cross-section at which the heating is effected. Supposing that the requirements mentioned under III, on page 249, are filled, the rise in blood-temperature  $\Delta t_{bl}$  and the minute volume  $V$  is given by the equation:  $V \cdot \Delta t_{bl} \cdot \rho = Q \dots \dots (1)$   $\rho$  being the specific heat of the blood and  $Q$  the quantity of heat supplied. Now the galvanometer deflection and, consequently, the surface-temperature difference  $\Delta t'$  will be a function of  $\Delta t_{bl}$ ,  $V$  and a series of coefficients  $C_1 \dots \dots C_n$  which are constant for the experimental apparatus, viz. for instance the geometrical dimensions of the vessel cross-section, the coefficient of heat



conduction and other thermic constants for the vessel wall etc., in such a manner that we may put  $\Delta t' = \varphi(\Delta t_{bi}, V, C_1 \dots C_n)$  or  $\Delta t_{bi} = \psi(\Delta t', V, C_1 \dots C_n)$  which together with (1) leads to the equation:  $V \cdot \rho = Q/\psi(\Delta t', V, C_1 \dots C_n) \dots \dots \dots$  (2) for the determination of  $V$ , when  $Q$ , the function  $\psi$ ,  $\Delta t'$  and the constants are known. In ABDERHALDEN's Handbuch (1929), REIN has determined, from the ordinary laws of heat convection, the functions  $\varphi$  and  $\psi$ . He demonstrates that the equation (2), by the introduction of these functions assumes the simple form of  $\Delta t' \cdot V^\alpha = k \dots$  (3), where  $k$  is constant,  $\alpha$  is a co-efficient ( $< 1$ ) which is characteristic for a given type of element. This is equal to just one for the ideal element, i. e. an element in which the temperature of the thermo-junctions is equal to the mean temperature of the blood, and in which the loss of heat to the surroundings is infinitely small. In this ideal case where  $\Delta t' = \Delta t_{bi}$ , equation (1) may be used for determining  $V$ . The curves representing the relation between  $\Delta t'$  and  $V$  become equilateral hyperbolas.

If, consequently, the thermo-galvanometer scale is divided into Celsius degrees, corresponding to the differential voltage measured on the thermo-junctions, it would be possible for any point of the current curve for an ideal element, to figure the corresponding mean volume per unit of time as the ratio of  $Q/\rho$  ( $Q$  being read on the Diawatt-meter) to the temperature difference read on the galvanometer scale. The commercially manufactured Rein-elements will perhaps not entirely fill the above mentioned ideal requirements, but the deviation is certainly not large, and it may be possible to manufacture a type of element coming still closer to the ideal. The reliability of the method requires of course an experimental confirmation, but if this has been done merely once for a type of element, the tedious model adjustment of the individual elements could be dispensed with in the future.

In the above, the problem of watt-measurements has rather been considered to be a question of pure measuring technique, as it has been assumed that the loss resistance, whether ohmic or complex, remains constant during the entire measurement. Under such conditions, the question is of more practical than theoretical importance, as an incorrect estimate of the resistance will here result merely in systematic but constant and in many cases relatively small errors.

The case is quite different, if the loss resistance in the blood vessel for some reason or other varies during the performance of the experiment. Such variations in the loss resistances may be produced by the functions of the particular animal experimented upon, but they can as shown below be produced by purely external causes as well. for instance by the injection into the blood-system of liquids as solutions of substances, the effect of which on the circulation is to be examined.

If flow measurements are to be performed during, or in direct connection with such an injection, these must evidently not be based on one single loss resistance measurement made before or after the injection. In such cases the Diawatt-method has its real value, as it allows with exceedingly great reliability a control of the constancy of the quantity of heat delivered, in periods during which the conductivity and loss resistance of the cross-section of the blood vessel varies continuously. In this laboratory, the procedure has been to register, on a single strip of film, 1) the thermo-galvanometer deflections (which form an expression for the blood-flow), 2) the high-frequency heating current and 3) the reading of the Diawatt-meter.

The arrangement for registration of the heating current is shown in Fig. 6a in which G indicates the generator, RE the Rein-element and TM the thermo-instrument for control of the heating current. In series with the latter, the thermo-cross TC is disposed, the secondary side of which is connected by way of the resistance R, to the mirror galvanometer  $G_0$ .  $G_0$  is of the same type as those used for measuring the thermo-voltage in the Rein-elements, i. e. with a low internal resistance, and R is adjusted in such a manner that the time of adjustment and damping conditions of  $G_0$  will be the same as for TM.

The arrangement for registration of the readings of the Diawattmeter is shown on Fig. 6b, in which DW is the Diawattmeter. The registration is effected by means of the mirror galvanometer  $G_1$  which is placed in parallel to the moving coil of DW.  $G_1$  is here a quickly oscillating, faintly damped, instrument,  $R_g$  being about 2,000  $\Omega$ , and its damping and oscillation period are adjusted by means of the coupling elements in such a manner that they have nearly the same values as DW. The filter consisting of a choking coil CH and a condenser C are provided in order to prevent any alternating voltages with a frequency of 50 periods originating from the alternating net from

having a disturbing effect on the reading of  $G_1$ . In the following way the quantity of heat evolved in the Rein element was kept constant.

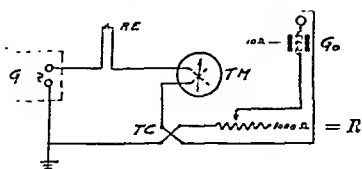


Fig. 6 a. Apparatus for optical registration of h. f. heating current.

G. = generator. RE = Rein element. TM = thermo-instrument. TC = thermo-couple.  $G_0$  = galvanometer.

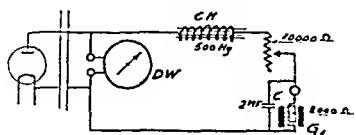


Fig. 6 b. Apparatus for optical registration of the readings of the Diawattmeter.

DW = Diawattmeter.  $G_1$  = Galvanometer.

During the entire stromuhr experiment, the reading of the Diawatt-meter is attended to by one of the assistants of the operator, and by a continual adjustment of the tuning members of the outlet circuit of the generator he returns the indicator of the Diawatt-meter to its initial position, whenever it shows the slightest tendency to move. After some experience, it is easy to maintain the position of the pointer practically stationary, in such a manner that during the entire experiment the galvanometer  $G_1$  will draw a horizontal straight line on the strip of film.

Fig. 7 shows an example of such an experiment. The Rein-element was placed at the right kidney vein of a rabbit getting at intervals a solution of 25 % sodium sulphate intravenously in order to study the effect on the blood-flow in the kidneys. Fig. 7 a shows the deflection of the instruments without any attempt to keep the heat deliverence in the element constant while Fig. 7 b shows the same, when the above mentioned adjustment of the outlet circuit of the generator was performed.

On the strip of film, scales are drawn for the h. f. heating current m. a. (quadratic scale), for the heat intensity W (linear scale) and for the minute-volume in  $\text{cm}^3$  calculated for the ideal case  $a = 1$ , equation (3) (hyperbolic scale). In order to facilitate an estimate of the accuracy with which the measurements may be made on the curves, the scales on Fig. 7a and 7b are drawn in their full length, with the zero point situated outside of the strip of film. Between the lines marked A and B, and during the course of about one minute,  $10 \text{ cm}^3$  of the solution of sodium sulphate are injected. In Fig. 7a it is seen that the Watt deli-

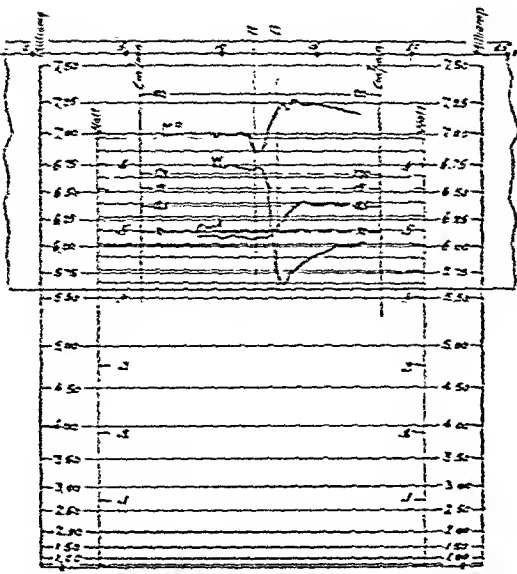


Fig. 7a. Stromuhr measurement without Watt correction.

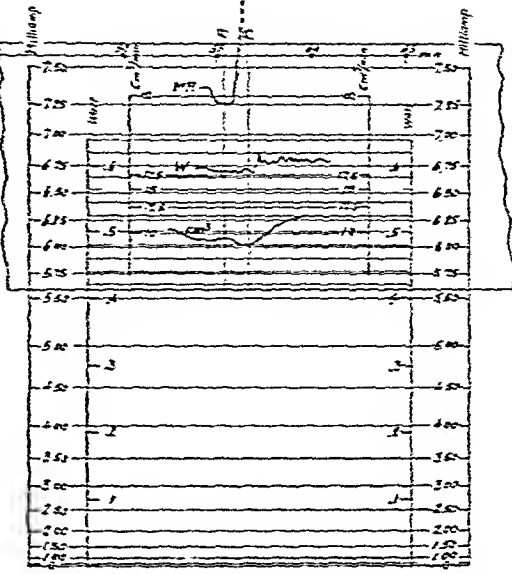


Fig. 7b. Stromuhr measurement with Watt correction.

very drops from .060 to .042 W. At the same time the minute volume curve shows an increase. This increase must be largely fictitious since the wattmeter shows that the heat deliverence has decreased considerably. The variation in the deflection of the thermo-galvanometer is nearly of the same magnitude (supposing the blood-flow to be constant) as the deflection that would be produced by the registered variation in the heat intensity. The heating current shows in its turn an increase from 7.0—7.25 m. a. If the estimation of the blood flow curve in this case should be based on the measurement of the heating current, it is seen that the variation in the blood-flow would rather be considered smaller instead of larger than measured. Thus a considerable error should be made. In Fig. 7b the injection was repeated about half an hour later. This time the said Watt correction has been effected during and after the injection, so that the heat intensity measured on the wattmeter only varied between .059 and .061 Watt, with the deviations distributed uniformly above and below the .060 line. The curve of flow shows an increase in minute-volume from 9 to 12 cm<sup>3</sup>, a rise which we now consider to be real as the wattmeter deflection was kept constant. If the Watt correction had not been performed we had to expect beyond the measured increase of

3 cm<sup>3</sup>, a further (fictitious) increase of the same order of magnitudes as the one registered in Fig. 7a. The high frequency current shows a considerable increase, so big that the deflection has gone out of the film. This variation consequently must be considered as an increased watt-less current in the complex resistance in the vessel's cross-section.

The experiment described shows that under certain circumstances considerable errors in the use of the stromuhr can appear. One main source of errors has thus been eliminated, while the new sources of errors introduced by the more complicated method of measurement can only cause systematic errors that may be kept under control.

The biological results of the experiments are to be published elsewhere.

### Summary.

A fundamental condition for work with Reissner's flowmeter ("die Thermo-Stromuhr") is that the quantity of heat evolved in an element must be maintained constant and measured. The quantity of heat has heretofore been determined as Joule's heat based on a measurement of the effective current and the resistance in the blood vessels cross-section. The latter is done by comparing this resistance with known ohmic resistances. In principle this procedure is not correct, as thus the impedances and not the effective resistances are measured. Also in practice the method is rather unsuitable for various reasons.

The present paper relates to a method developed from an invention made by G. PEDERSEN allowing a measuring of the high-frequency energy — based upon a control of the internal functions of the generator — delivered by the generator to a load which may be purely ohmic or complex, and concerning the value of which only the *order of magnitude* has to be known.

A detailed description is given of a certain construction of the measuring arrangement. It is demonstrated that the measurement can now be effected more quickly and reliably than according to the method used heretofore. An indication is given of the possibility opened by these means for interpreting quantitatively under certain circumstances the plotted stromuhr curves in a simpler manner than heretofore.

It is further demonstrated that the method opens a new field for stromuhr measurements, as the latter may now also be per-

formed under conditions involving, for external or internal reasons, considerable and continuous changes in the conductivity and the effective resistance of the cross-section of the vessel, during the performance of the experiment.

#### References.

- BALDES, E. F., and I. F. HERRICK, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1937. 37. 432.
- BARCROFT, H., and W. M. LOUGHRIDGE, J., *Physiol.* 1938. 93. 382.
- BURTON, A. C., *J. appl. Physics* 1938. 9. 1.
- GILDEMEISTER, M., *Handb. norm. pathol. Physiol.* 1928. 8. 657.
- KOLIN, A., *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1936. 35. 53.
- PEDERSEN, G., Danish Patent No. 52666 Kl. 21. e—32.
- REIN, H., *Z. Biol.* 1928, 87. 5. 394.
- , *Abderhalden's Hand. Biol. Arb. Meth.* 1929. 8:4. 693.
- SCHMIDT, C. F., and A. WALKER, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1935—36. 33. 346.
-

## Factors Influencing Renin Pressor Action.<sup>1</sup>

By

U. S. v. EULER and TORGNY SJÖSTRAND.

---

TIGERSTEDT and BERGMAN discovered in 1898 that kidney extracts contain an undialysable pressor substance, unstable to heat, which they named renin. Division of the vagi in the neck did not inhibit the action of renin in rabbits, and it was found, further, that the effect was still present after section of the spinal cord in the neck, but weakened after pithing. It was concluded from these experiments that renin produced its action chiefly by peripheral vasoconstriction though some effect on spinal centres could not be excluded. In experiments with purified preparations on dogs HESSEL (1938) also demonstrated a peripheral action. PAGE (1939) observed that renin caused a fall in blood pressure in the cat after decerebration, whereas the pressor response reappeared after pithing, the latter result indicating a peripheral action.

From his experiments on rabbits in chronic renal hypertension, however, DOCK (1940) was led to believe that the hypertensive factor probably exerts some influence on the vasomotor centre.

It does not seem definitely established that all investigators have been dealing with the same active principle in their "renin" preparations, especially in view of the conflicting statements with regard to some of the peripheral effects, e. g. on isolated organs (cf. HESSEL and BRAUN-MENENDEZ and co-workers 1940). Recent investigations have shown, moreover, that kidney extracts of renin-type may form a secondary pressor substance of different character, now known as hypertensin or angiotonin (BRAUN-MENENDEZ et al. 1939, 1940, PAGE and HELMER, 1940).

---

<sup>1</sup> Received 28 April 1941.

The present paper describes some experiments which have been carried out in order to study the mechanism of renin action with special reference to neurogenic factors.

## Methods.

Renin was prepared in the following way. Pig kidney cortex was finely ground, extracted twice with 2 volumes of acetone and dried. After grinding the dry powder was extracted twice with 5 volumes of 2 % NaCl. The centrifuged solution was concentrated in vacuo and treated with acetic acid and sodium acetate, until no more precipitate was obtained. The clear filtrate was dialysed against running water in cellophane bags and concentrated so that 1 ml of the solution corresponded to 2—4 g of the dry powder. 0.25—1 ml of the renin solution produced a suitable rise in blood pressure in the cat or the rabbit for test purposes. The purity of the extract was controlled by boiling, which abolished the effect.

The experiments were performed on cats and rabbits, either decerebrated under ether anaesthesia or anesthetized with chloralose, 0.07 g per kg of body-weight (cats), or urethane 1.75 g per kg (rabbits).

Tachyphylaxis was encountered in some cases, as already observed by TIGERSTEDT and BERGMAN and confirmed by subsequent investigators, but seldom to any significant extent unless frequent injections with large doses were made.

## Results.

### I. Cats.

#### a) *Effect of decerebration at different levels on the renin effect.*

In all the experiments a test injection of 0.25—1 ml renin was made before the operative procedures and produced the usual slow rise and lasting effect on the blood pressure. After decerebration the effect was changed in different directions, depending on the level of decerebration. If the decerebration was performed so as leave the quadrigeminal corpora uninjured, the full renin effect was obtained with both chloralose and ether anaesthesia (7 cases) (Fig. 1). In several cases there was even a moderate increase in the pressor response. When the decerebration was made further caudally, a definite diminution of the effect could be observed. Thus, if the cut was made between the anterior and posterior quadrigeminal corpora, the effect was much reduced (Fig. 1 B). If the posterior quadrigeminal corpora were also removed, a further reduction in the response occurred, and in most cases also a fall



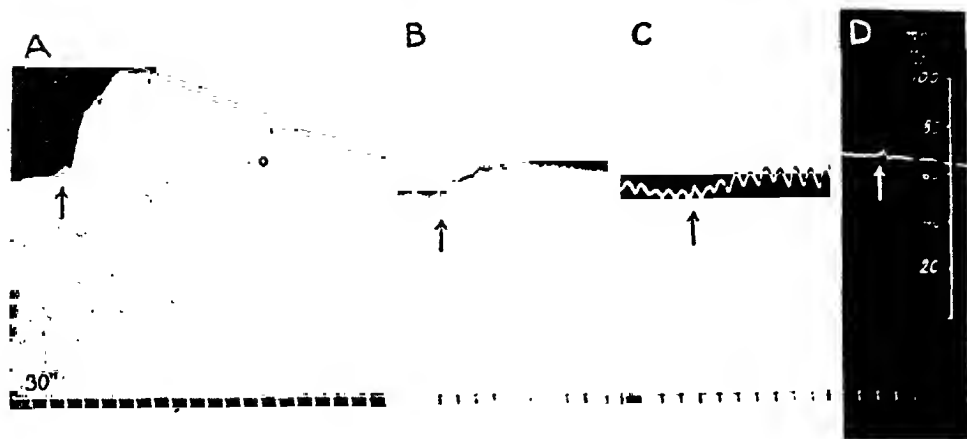


Fig. 1. Blood pressure, cat, chloralose, decerebrated in front of the anterior quadrigeminal bodies. A-D, 0.5 ml renin intravenously. Between A and B ablation of the anterior quadrigeminal bodies. Between B and C ablation of the posterior quadrigeminal bodies. Between C and D further removal of 6-8 mm of the brain stem. In D artificial respiration.

in blood pressure and disturbances in the respiration and circulation (Fig. 1 C). The respiratory movements mostly changed to the apneustic type, and slow blood pressure waves occurred. The results reported by PAGE (1939) with regard to the effect of decerebration on the renin effect might therefore correspond to the reactions described here.

When a section was made directly at the upper margin of the pyramides or just behind the posterior quadrigeminal bodies, without previous sections at higher levels, the renin pressor effect was also greatly diminished, but still present. The blood pressure was maintained at a good level (90 mm Hg) after these operative procedures.

If the section was extended further caudally in the region of the medullar vasomotor and respiratory centres, however, the effect of the renin test dose was abolished (Fig. 1.D), even though there was no change in general blood pressure.

#### b) *Renin effect on the spinal cat.*

The effect of central injuries could also be demonstrated by tying off the afferent cerebral vessels (carotids and vertebral arteries) or by using a McDowall vertebral artery clamp for occlusion of the latter. After the initial rise in blood pressure a lasting fall followed, and renin injections were now much less effective even after restoring of the vertebral circulation.

PAGE (1939) has reported that, even though decerebration abolished the pressor effect of renin, the effect reappeared on pithing the spinal animal. We divided the spinal cord in the neck in 15 cases and tested the renin effect. In all instances the effect of the test dose was greatly reduced and only with big doses could a small effect on the blood pressure be elicited.

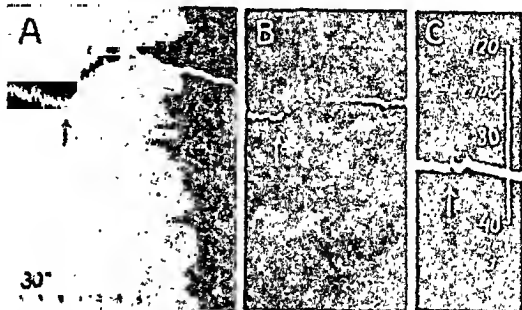


Fig. 2. Blood pressure, cat, chloralose. A—C 0.5 ml renin intravenously. Between A and B section of the spinal cord at  $D_3$ — $D_4$ . Between B and C section at  $C_6$ — $C_7$ .

In order to analyse further the inhibiting action of cord section on the renin effect, we sectioned the spinal cord from below at various levels. When the cord was transected at the level of  $D_3$ — $D_4$  the pressor action was considerably reduced, but there was still a definite effect (Fig. 2). A further section at  $D_1$ — $D_2$  did not appreciably alter this result. When, now, a section was made at about  $C_6$ — $C_7$ , the pressor effect of the test dose was much reduced, indicating a disturbance in the conditions essential for the development of the pressor effect.

### c) Action of ergotoxine and novocaine on the renin pressor effect.

Different results have been reported with respect to the action of ergotamine on the renin effect. HESSEL (1938) found no inhibition of the pressor response after ergotamine, and HELMER and PAGE (1939) arrived at similar results. WILLIAMS, on the other hand, found that ergotamine counteracted the effect of renin in rat experiments.

In experiments on cats and rabbits we have found that doses of ergotoxine sufficient to inhibit the adrenaline pressor effect also effectively reduced the renin response. Thus after about 2—4 mg ergotoxine per kg intravenously the effect was greatly reduced.

Similar discrepancies occur in the literature as regards the influence of cocaine on the pressor response of renin. HESSEL (1938) and PAGE (1939) found no potentiating effect of cocaine, but BRAUN-MENENDEZ and co-workers have observed an increase in renin response.

After administration of novoeaine, either intralumbally or intramuscularly in doses of 0.5—1 ml of a 10 % solution we have observed an increase in the renin pressor response. When novocaine was injected subdurally into the spinal canal in the lumbar region, causing a moderate lowering of the blood pressure, the renin response was more than doubled.

In order to test the possible interference of changes in blood pressure and general changes in reactivity of the vessels, we have used adrenaline and tyramine as control substances. Intralumbal administration of novocaine increased the effect of all substances and also that of hypertensin. This effect remained in some cases even after section of the cervical cord.

Further experiments showed, however, that the potentiating effect of novocaine was in all probability partly due to the inactivation of the pressoregulating system of the carotid sinus and aorta, as shown by the negative carotid occlusion test, and partly to an increased response owing to the altered vascular state. No evidence for a true potentiation, such as for adrenaline, has been obtained.

*d) Relation of renin effect to the level of the systemic blood pressure and blood pressure regulators.*

Though test injections of adrenaline and tyramine showed that the response was good even in the spinal cat with a blood pressure of around 40 mm of pressure it seemed desirable to try whether the renin effect was to any considerable degree dependant on the blood pressure.

Lowering of the blood pressure was effected by bleeding the animals or opening the abdomen and manipulating the bowels. Test doses of renin were injected at levels varying from about 100 down to 30 mm Hg. Generally the effect was unaffected or even slightly enhanced down to 40—50 mm, but below this pressure a certain reduction in the response usually took place, though the effect in all cases was definite. In the experiments reported above we observed, however, that, even in those cases where the blood pressure was higher than 50 mm, low section of the brain stem or decapitation was invariably accompanied by a large reduction of the pressor response or its total disappearance, respectively. The blood pressure, therefore, does not alone serve as an indicator for the vascular state and the circulatory conditions necessary for the renin pressor response.

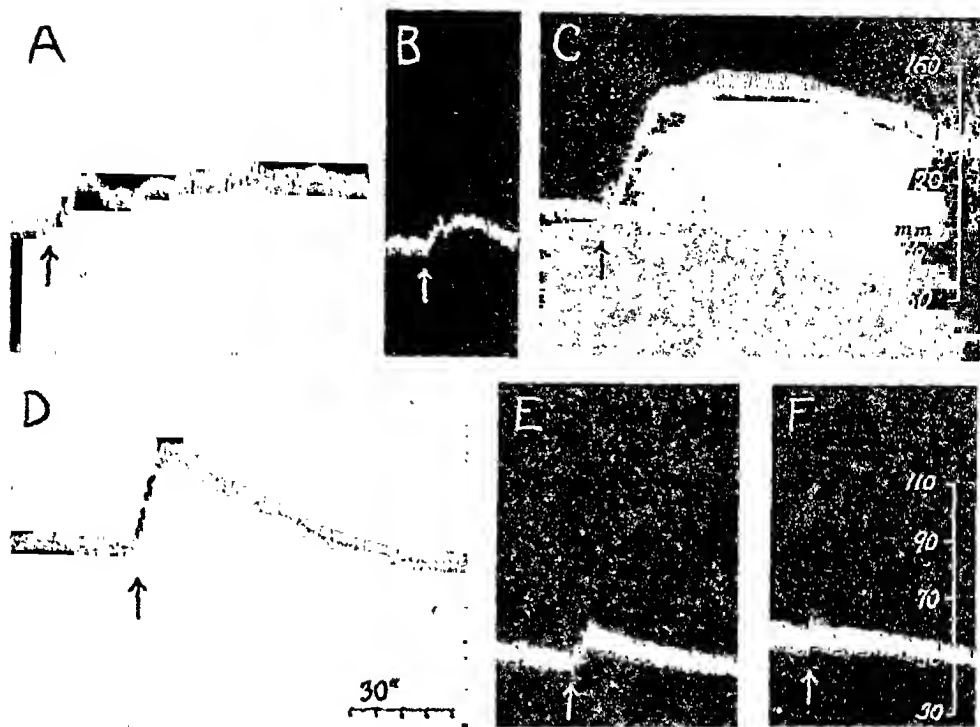


Fig. 3. Blood pressure, cat, chloralose. A, C, F, 0.25 ml renin, B, D, E, 5 ml hypertensin intravenously. Between B and C denervation of sinus and vago-depressors. Between D and E, section of the spinal cord at  $C_7$ .

Section of the sinus nerves and both vagodepressors increased the renin pressor response (Fig. 3). This is in accordance with the general moderating effect of the pressoregulators, especially pointed out by CUYPERS (1935) in a publication from HEYMANS' laboratory.

e) *Relations between the renin and hypertensin effects on the blood pressure.*

When renin is incubated with blood plasma or serum or blood globulins a pressor substance is formed. This alcohol soluble and dialysable substance has been called hypertensin (BRAUN-MENENDEZ and co-workers, 1939, 1940) or angiotonin (PAGE and HELMER, 1940) and differs from renin in its quicker and less lasting effect on the blood pressure and also in other respects.

We have confirmed the formation of a substance of this kind, and also found that the substance can be prepared by adding renin to blood serum or blood globulins and leaving the mixture for dialysis at room temperature through cellophane. The outer

fluid is collected after 12 hours' dialysis and concentrated to about  $\frac{1}{5}$  of the serum volume. A few ml of this dialysate produces a rise in blood pressure on intravenous injection in the cat, obviously of the same kind as hypertensin or angiotonin. Boiling does not destroy the activity of this substance (Fig. 4).

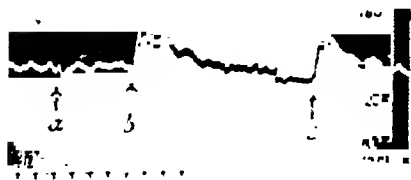


Fig. 4. Blood pressure, cat, chloralose. a,  $\frac{1}{10}$  of concentrated dialysate from 100 ml bovine serum and 3 ml inactivated renin, b, same, prepared with renin, c, same preparation as b, but boiled for 2 minutes.

The activity of hypertensin was generally less reduced than that of renin in the spinal animal, especially when the blood pressure was low (fig. 3).

## II. Rabbits.

Essentially the same results were obtained on rabbits as on cats. Decerebration did not prevent the action of our renin preparation, but after section of the spinal cord in the neck or the clamping of the vertebral arteries, the action of renin was insignificant or absent unless much bigger doses were used. Even after intravenous infusion of adrenaline which raised the general blood pressure in the spinal animal no definite action was obtained with the previously active doses, though adrenaline caused a prompt and strong effect on the blood pressure, as was expected.

## Discussion.

The experiments reported in this paper have demonstrated that the pressor effect of renin may be greatly diminished as a result of central injuries.

The renin preparations of TIGERSTEDT and BERGMAN, and HESSEL, both exhibit peripheral actions. On the other hand, HESSEL states that his substance constricts the vessels of the hind legs of the frog and the isolated rabbit's ear, which is in disaccord with the results of BRAUN-MENENDEZ and his co-workers and PAGE, who did not find this action, unless serum or blood globulines had been added to the renin solution. Further experiments will be necessary to reconcile these different statements. The importance of repeated testings of the effect of heat treatment and the effect of redialysis suggests itself, however. It has been

claimed that renin produces its action on the blood pressure by the formation and intermediary action of a heat-stable dialysable substance (hypertensin, angiotonin). We have confirmed the statements as to the formation of such a substance under conditions involving as little disturbance as possible in the physicochemical system of renin and blood serum (incubation at room temperature and dialysis). The formation of such a substance *in vivo* is likely to occur. Whether this substance is solely responsible for the pressor effect of renin *in vivo* remains to be shown. The results of FRIEDMAN, SELZER and SAMPSON (1941) seem to indicate that hypertensin or renin cannot explain the whole effect of ischemic kidney venous blood.

The fact that our renin preparations were much less active after decapitation whereas hypertensin preparations maintain a good deal of their action need not invalidate the assumption that hypertensin is the mediating substance for the pressor effect, since the formation of hypertensin in the former case might have been less effective.

As to the mechanism for the pressor effect it has been repeatedly assumed that the pressor response is in some way related to sympathomimetic activity. WILLIAMS (1938) suggests that the effect may be due to a gradual liberation of an adrenaline-like substance. Another indication, admittedly of an indirect nature, is the finding of BRAUN-MENENDEZ and co-workers that ephedrin reinforces the action of renin, an action which is also known to occur for adrenaline (SCHAUMANN, 1928, BURN and TAINTER, 1931, MORTON and TAINTER, 1940). The former authors state that F. 933 does not prevent the renin effect, nor is this the case for mediated sympathetic actions of adrenergic type.

HEINSEN and WOLF (1935) demonstrated the presence of tyramine in the blood of hypertensive dogs and GOVAERTS and DICKER (1935) found a certain resemblance between the pressor effect of hypertensive serum and tyramine. Recently MORTON and TAINTER (1940) extended earlier work on the relative potency of sympathomimetic drugs and confirmed the potentiating effect of tyramine on the adrenaline vasoconstrictor effect (BURN and TAINTER, 1931). The mechanism for this action is believed to be a blocking of the normal local destruction of adrenaline by tyramine, and also by ephedrine. This finding is of considerable interest in view of the recent experiments by HOLTZ and HEISE (1939) and by BING (1941). WILLIAMS and GROSSMAN (1938) have reported

the recovery of an adrenaline-like substance from the kidney. A rise in blood pressure, together with unhampered peripheral circulation which is characteristic of renal hypertension, is also brought about by a sympathomimetic drug,  $\alpha$ -N-dimethyl-p-hydroxyphenyl-ethylamin (KAPP, FRIEDLAND and LANDIS, 1941).

Experiments by HEYMANS et al. (1937) and BOUCKAERT et al., (1936) suggest that the arterial hypertension induced by renal ischemia "may be due to a humoral factor which increases the excitability of the peripheral blood vessels to constrictor stimulations, mainly to the neurogenic vasoconstrictor influences; the same humoral factor inducing, on the other hand, a direct peripheral vasoconstriction and a disturbance in the physiologic mechanisms of the pressoreceptive reflex regulation of blood pressure". The results reported in this paper may be explained in accordance with the opinion of these authors, but further experiments will have to show whether the diminished action after central injuries is due to reduced reactivity of the vessels or whether the formation of the vasoconstrictor agent is interfered with as a result of the accompanying circulatory changes, or both.

### Summary.

1. The pressor effect of renin is unaffected or slightly increased after anterior decerebration in the cat.
2. Decerebration at a level just in front of or behind the posterior quadrigeminal corpora reduces the effect of renin.
3. Sections in the lower part of the medulla oblongata greatly reduces the renin effect, as does section of the cervical spinal cord, probably as a result of circulatory and vascular changes.
4. If renin is added to blood serum or blood globulines the pressor substance formed (hypertensin, angiotonin) can be recovered by dialysis.

This work has been aided by a grant from the Foundation "Therese and Johan Anderssons Minne".

## References.

- BING, R. J., Amer. J. Physiol. 1941, *132*, 497.
- BOUCKAERT, J. J., L. ELAUT and C. HEYMANS, J. Physiol. 1936, *89*, 3 P.
- BRAUN-MENENDEZ, E., J. C. FASCIOLO, L. F. LELOIR and J. M. MUÑOZ, Rev. Soc. Argent. Biol. 1939, *15*, 420.
- BRAUN-MENENDEZ, E., J. C. FASCIOLO, L. F. LELOIR and J. M. MUÑOZ, J. Physiol. 1940, *98*, 283.
- BURN, J. H. and M. L. TAINTER, Ibidem. 1931, *71*, 169.
- CUYPERS, H., Arch. int. Pharmacodyn. 1935, *50*, 226.
- DOCK, W., Amer. J. Physiol. 1940, *130*, 1.
- FREEMAN, N. E. and I. H. PAGE, Heart. 1937, *14*, 405.
- FRIEDMAN, M., A. SELZER and J. J. SAMPSON, Amer. J. Physiol. 1941, *131*, 799.
- GOVAERTS, P. and M. E. DICKER, Bull. Acad. Méd. Belg. 1936, 141.
- HEINSEN, H. A. and H. J. WOLF, Arch. exp. Path. Pharmac. 1930, *150*, 173.
- HELMER, O. M. and I. H. PAGE, J. Biol. chem. 1939, *127*, 757.
- HESSEL, G., Klin. Wschr. 1938, *17*, 843.
- HEYMANS, C., J. J. BOUCKAERT, F. BAYLESS, L. ELAUT and A. SAMAN, C. R. Soc. Biol. Paris 1937, *126*, 434.
- HOLTZ, P. and R. HEISE, Arch. exp. Path. Pharmac. 1939, *191*, 87.
- KAPP, F., C. K. FRIEDLAND and E. M. LANDIS, Amer. J. Physiol. 1941, *131*, 710.
- MORTON, M. C. and M. L. TAINTER, J. Physiol. 1940, *98*, 263.
- PAGE, I. H., J. exp. Med. 1939, *70*, 521.
- PAGE, I. H. and O. M. HELMER, Ibidem. 1940, *71*, 29.
- SCHAUMANN, O., Arch. exp. Path. Pharmac. 1928, *138*, 208.
- TIGERSTEDT, R. and P. G. BERGMAN, Skand. Arch. Physiol. 1898, *8*, 223.
- WILLIAMS, J. R., Amer. J. Physiol. 1938, *124*, 83.
- WILLIAMS, J. R. and E. B. GROSSMAN, Ibidem. 1938, *123*, 364.
-



## Vasokonstriktorische Wirkungen von Nierenextrakten und ihre Beziehungen zu Renin und Vasotonin.<sup>1</sup>

Von

U. S. v. EULER und TORGNY SJÖSTRAND.

---

Durch die Entdeckung von TIGERSTEDT und BERGMAN (1898), dass Extrakt frischer Nierenrinde eine blutdrucksteigernde Wirkung entfaltet, wurde erstmalig eine sichere Beziehung zwischen Nieren und Hochdruck dargestellt, die schon längst vermutet war. Die wirksame Substanz wurde von den Entdeckern Renin genannt und dieses bezüglich einer Reihe seiner wichtigeren Eigenschaften charakterisiert. Es steht somit fest, dass Renin ein nichtdialysabler, thermolabiler Körper ist, was ihn gegen anderen bekannten blutdrucksteigernden oder vasokonstriktorischen Stoffen abgrenzt.

Wir haben in der vorliegenden Untersuchung die näheren Beziehungen zwischen Renin und der seit langem bekannten vasokonstriktorischen Substanz aus Serum mit Hinblick auf ihre Gefäßwirkungen aufgenommen. Neuere Ergebnisse hinsichtlich der Natur und Wirkungsweise des Renins (KOHLESTAEDT, HELMER und PAGE, 1938, BRAUN-MENENDEZ ET AL. (1939, 1940), PAGE und HELMER, 1940) haben es besonders wünschenswert gemacht, die verschiedenen in Nierenextrakten und Serum vasokonstriktorisch wirksamen Stoffe bezüglich ihrer Wirkungen genau zu charakterisieren. Die Feststellung der obigen Autoren, dass Renin auf die Globulinfraktion des Blutes derart einwirkt, dass ein neuer blutdrucksteigernder, thermostabiler und dialysabler Stoff entsteht, scheint von grosser Bedeutung zu sein. Dieser Stoff wurde Hy-

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 28. April 1941.

pertensin bzw. Angiotonin genannt. Es können also die folgenden vasokonstriktorisch wirksamen Stoffe aus Nieren und Blut von einander getrennt werden.

Renin	Thermolabil	Nichtdialysabel	Niere
Vasotonin	Thermostabil	»	Serum
Hypertensin } Angiotonin }	»	Dialysabel	{ Aus Renin + Blut- globuline

Der »Aktivator« von PAGE und Mitarbeiter scheint der Globulinfraktion von BRAUN-MENENDEZ ET AL. zu entsprechen. Bei dem von PAGE angeführten Verfahren zur Herstellung des »Aktivators« wird, wie im folgenden gezeigt wird, das im Serum normal auftretende Vasotonin wenigstens teilweise ausgefällt. Da aber die für die Hypertensinherstellung erforderliche Eiweissfraktion auch aus Plasma, das kein Vasotonin enthält, hergestellt werden kann (BRAUN-MENENDEZ ET AL.), geht hieraus hervor, dass das Vasotonin keine notwendige Voraussetzung für die »Aktivator«-Wirkung ist.

### Methodisches.

Zur Herstellung des Renins wurde die Rinde frischer Schweine-  
nieren zermahlen und mit 2 Volumina Azeton zweimal extrahiert. Nach Trocknen und Pulverisieren wurde nachher die Nierensubstanz mit 5 Gewichtsmengen 2 % NaCl zweimal extrahiert, das Extrakt zentrifugiert und mit Azetat-Essigsäure gefällt. Das Filtrat wurde in vacuo eingengt und 2 Tage lang gegen fliessendes Wasser in Zellophan-schläuchen dialysiert. Das so erhaltene Reninpräparat war praktisch farb- und geschmacklos und reagierte neutral. 0.5—1 ml, etwa 0.5—1 g Trockenpulver entsprechend, zeigte auf die Katze in Chloralosenarkose eine gute blutdrucksteigernde Wirkung, die nach kurzer Erhitzung auf 100° C. aufgehoben war.

Diejenige Blutserumfraktion, die von HELMER und PAGE als Aktivator bekannt wird, wurde nach den Angaben dieser Autoren hergestellt. Dieses Extrakt zeigte in unseren Versuchen regelmässig eine vasokonstriktorische Wirkung an isolierten Organen, war aber selbst in grossen Dosen bei intravenöser Injektion ohne Wirkung auf den Blutdruck des Ganztieres. Wir haben diese Extrakte als Vasotoninpräparate benutzt, da ihre Wirkung mit der typischen Vasotoninwirkung des Serums übereinstimmte.

In einigen Versuchen haben wir Hypertensin nach den Angaben von BRAUN-MENENDEZ ET AL. bereitet und haben die Wirkungen des so entstandenen Stoffes bestätigen können (EULER und SJÖSTRAND, 1941). Das Angiotonin von PAGE und HELMER, dürfte, allem Anschein nach, mit dem Hypertensin von BRAUN-MENENDEZ ET AL. identisch sein.

Zur Prüfung der Blutdruckwirkungen haben wir Kaninehen (Urethan 1.75 g kg), Katzen (Chloralose 0.07 g kg) und Hunde (Chloralose 0.1 g kg) benutzt. Zwecks Prüfung der Gefäßwirkung an verschiedenen Organen und Gefäßbezirken wurden diese mit defibriniertem Rinderblut mittels einer Perfusionspumpe gespeist. Wegen der starken vaso-konstriktorischen Wirkung frisch defibrinierten Blutes konnte unverdünntes Blut nur ausnahmeweise verwendet werden; meistens wurde Blut mit gleichen Teilen Ringerlösung verdünnt benutzt, und ausserdem oft durch Rindernieren vorzirkuliert, um den Gehalt an Vasotoninen zu verringern. Das so passierte Blut zeigte eine nur unbedeutende gefässkontrahierende Wirkung.

## Ergebnisse.

### I. Einwirkung von Nierenextrakt (Renin) an verschiedenen Gefäßgebieten.

#### a) *Ganztier.*

Die von uns verwendeten Reninpräparate wirkten blutdrucksteigernd bei intravenöser Zufuhr an Katzen, Hunden und Kaninchen. Die Blutdrucksteigerung entwickelte sich in den meisten Fällen im Laufe einiger Minuten zu voller Höhe und dauerte etwa 8—15 Minuten. Bisweilen trat die Wirkung recht schnell ein und dauerte dann in der Regel kürzere Zeit. Das schon von TIGERSTEDT und BERGMAN beobachtete Verhalten, dass nachfolgende Dosen bisweilen weniger aktiv waren (Tachyphylaxie), konnte bestätigt werden, jedoch trat diese Wirkung gewöhnlich erst nach mehreren, bald auf einander folgenden und nicht zu kleinen Dosen ein.

Die Wirkung bestand in einer reinen Drucksteigerung. Als Kriterium der reinen Reninwirkung haben wir die Einwirkung durch Erhitzung auf 100° während 2 Minuten benutzt. Selbst die 10-fache Menge einer gut wirksamen Dosis übte dann keine Blutdruckwirkung irgendwelcher Art aus.

#### b) *Hinterkörper.*

Bei diesen Versuchen haben wir Katzen und Kaninchen benutzt, denen Kanülen in die Bauchorta und in die Vena cava eingebunden waren. Die Reninjektionen geschahen an der arteriellen Seite kurz vor der Kanüle. Die Durchblutung war bei dem verwendeten Druck, 100—150 mm Hg, befriedigend, besonders wenn inaktiviertes Blut, mit Ringerlösung verdünnt, zur Anwendung kam.

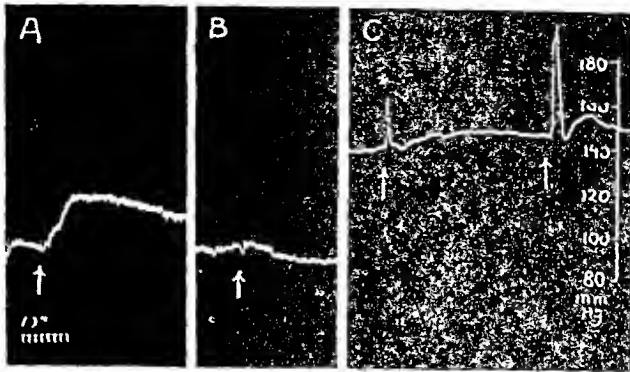


Fig. 1. A. Blutdruck, Kaninchen, Urethan, 1 ml Renin. B. 3 ml Vasotonin. C. Perfusionsdruck, Hinterkörper, Kaninchen. Perfusionsflüssigkeit Schweineblut — Ringer 1 + 1. 1 ml Renin, 3 ml Vasotonin.

Sowohl an Katzen wie Kaninchen trat mit Reninpräparaten regelmässig eine Vasokonstriktion ein, deren Dauer und Grösse jedoch von den Durchblutungsbedingungen weitgehend abhängig war (Fig. 1 und 6). Die Wirkung trat sowohl mit Rinder- als auch Schweineblut als Perfusionsflüssigkeit zu Tage, und auch mit Ringerlösung, besonders bei kleinem Durchströmungsvolumen (Fig. 2).



Fig. 2. Kaninchenhinterkörper mit Ringerlösung perfundiert. a und c 3 ml. Renin, b. 3 ml Renin 3 Minuten gekocht.

c) Lunge.

Bei Perfusion der Kaninchenlunge konnte ebenfalls eine vasokonstriktorische Wirkung seitens Renin nachgewiesen werden, die nach Erhitzung des Renins verschwand (Fig. 3).

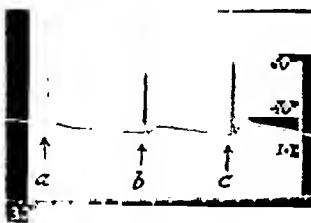


Fig. 3 A.

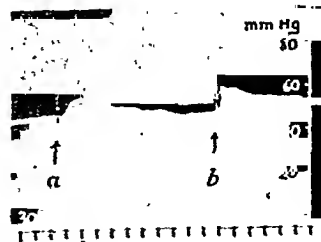


Fig. 3 B.

Fig. 3. A. Kaninchenlunge mit Schweineblut-Ringer 1 + 3 perfundiert. a. 2 ml Renin 3 Minuten gekocht, b. 1 ml Vasotonin, c. 2 ml Renin. B. Kaninchenlunge mit inaktiviertem Schweineblut-Ringer 1 + 1 perfundiert. a. 0.5 ml Renin, b. 0.5 ml Vasotonin.

d) *Niere.*

An der Schweineniere wurde eine vasokonstriktorische Wirkung von Reninpräparaten ausgelöst. Auffallenderweise stellte es sich aber heraus, dass diese Wirkung zum grössten Teil auch nach Erhitzung des Extraktes weiter bestand (Fig. 4). Es dürfte hieraus folgen, dass die beobachtete Wirkung in diesem Falle nicht auf das Renin selbst zurückzuführen ist, sondern auf eine andere im Extrakt enthaltene Substanz, die an anderen Organen in den verwendeten Mengen ohne wesentliche Wirkung ist. Bis-

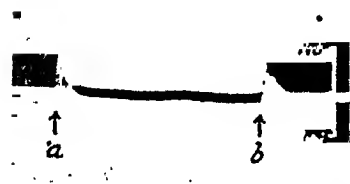


Fig. 4. Schweineniere mit Schweineblut-Ringer 1 + 1 perfundiert. a. 3 ml Renin 2 Minuten gekocht, b. 3 ml Renin.

weilen konnte sogar eine nicht unerhebliche Verstärkung der Wirkung nach Erhitzen der Reninextrakte beobachtet werden.

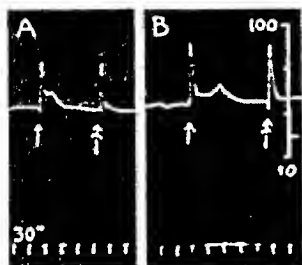


Fig. 5. Kaninchenohr mit Ringerlösung (A) und inaktiviertem Schweineblut-Ringer 1 + 1 perfundiert. ↑ 0.5 ml Vasotonin, ↑ 0.5 ml Renin.

e) *Kaninchenohr.*

Am Kaninchenohr konnte in keinem Falle eine vasokonstriktorische Wirkung durch Renin beobachtet werden, unabhängig davon, ob das Ohr mit Blut oder Ringerlösung perfundiert wurde (Fig. 5). Die fehlende Wirkung dürfte darauf zurückzuführen sein, dass das für die Reninwirkung notwendige Komplement in ungenügenden Mengen vorhanden ist.

## II. Einwirkung von Vasotoninpräparaten auf verschiedene Gefässbezirke.

Die Wirkungen des »Aktivator«-präparates, nach HELMER und PAGE hergestellt, stimmten weitgehend mit denjenigen des sog. Vasotonins überein und es schien uns berechtigt, diese Präparate als Vasotoninpräparate zu benutzen. Dieses in defibriniertem Blut und Serum von O'CONNOR (1912) nachgewiesene Prinzip ist noch recht wenig bekannt. Es ist nichtdialysabel und thermostabil und wahrscheinlich von Proteinnatur. HEYMANS, BOUCKAERT und MORAES zeigten im Jahre 1932, dass die Vasotoninwirkung durch Ergotamin aufgehoben werden konnte. Es ist ferner be-

kannt, dass die wirksame Substanz bei Durchströmung durch die Lungen inaktiviert wird, was bei Perfusionsversuchen an isolierten Organen weitgehend zur Entfernung des manchmal lästigen vasokonstriktorischen Effektes benutzt wird. Das Vasotonin dürfte auch mit dem Spätgift von FREUND in enger Beziehung stehen. Ferner soll erwähnt werden, dass BORNSTEIN die Beobachtung gemacht hat, dass defibriniertes Hundeblood seinen vasokonstriktorischen Effekt beim 24-stündigen Stehen im Eisschrank bei  $+5^{\circ}$  verliert.

Der Vasotoninwirkung frisch defibrinierten Blutes wurde in unseren Versuchen, wie schon erwähnt, teilweise dadurch entgegenwirkt, dass das Blut mit Ringerlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt wurde. In vielen Versuchen wurde das mit Ringer verdünnte Blut durch Rindernieren perfundiert, was eine Inaktivierung des Vasotonins herbeiführte. Dies war bei der Prüfung der Vasotonineffekte auf verschiedene Gefäßgebiete von wesentlicher Bedeutung.

#### *a. Vasotoninwirkungen am Ganztier.*

In keinem Fall ist es uns gelungen, eine blutdrucksteigernde Wirkung des Vasotonins am Ganztier nachzuweisen, obschon die Extrakte am isolierten Gefäßgebiete stark vasokonstriktorisch wirksam waren (Fig. 1). Wir sehen hierin auch einen Beleg dafür, dass die an übrigen Gefäßgebieten beobachteten Wirkungen nicht etwa durch Beimengung anderer gefäßwirksamer Stoffe verursacht sind. Wurden jedoch grössere Mengen intraarteriell infundiert, trat eine Blutdrucksteigerung ein. Der Unterschied zwischen der Wirkung am Ganztier bei intravenöser und intraarterieller Darreichung dürfte auf der bekannten Inaktivierung des Vasotonins in den Lungen bezogen werden.

#### *b. Hinterkörper.*

Am perfundierten Hinterkörper der Katze und des Kaninchens konnte bei Vasotoninzusatz eine deutliche Vasokonstriktion beobachtet werden (Fig. 1). Nach Zusatz von Ergotamin (2.1 mg auf 200 ml Blut) war die Wirkung von Vasotonin wie diejenige von Renin vollständig aufgehoben (Fig. 6).

#### *c. Lunge.*

Auch an der Lunge war die Wirkung gut nachweisbar, sowohl bei Perfusion mit Blut-Ringer als mit Ringerlösung allein (Fig. 3).

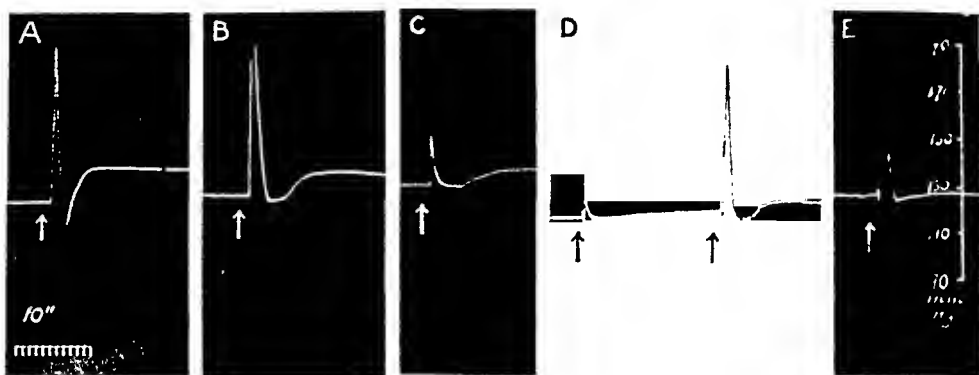


Fig. 6. Katzenhinterkörper mit Schweineblut-Ringer 1 + 1 perfundiert. A. 3 ml Renin, B. 3 ml Vasotonin, C 5  $\mu$  g Adrenalin. Zwischen C und D 2.1 mg Ergotaminäq. zu 200 ml Perfusionsflüssigkeit zu gesetzt, D. 5  $\mu$  g Adrenalin, 3 ml Renin., E. 3 ml Vasotonin.

#### d. Niere.

An der Niere war die Wirkung von Vasotoninpräparaten oder defibriniertem Blut immer sehr ausgesprochen und es stellte sich die Frage auf, ob diese Wirkung wenigstens zum Teil etwa durch Aktivierung des Renins zustande kam. Da wir aber in keinem Falle mit unseren Vasotoninpräparaten — auch mit bedeutend grösseren Mengen als die zur Injektion verwendeten — in Inkubationsversuchen eine »Aktivierung« bei Zugabe von Renin beobachtet haben, glauben wir hieraus schliessen zu können, dass diese Wirkung vom Vasotonin selbst herrührt. Wenn anderseits Vasotoninhaltiges defibriniertes Blut längere Zeit einwirken dürfte, liess sich eine derartige Einwirkung von Nierenrenin nicht ausschliessen, da die Vasotonindrosselung der Nierengefässe wohl eine gewisse Ischämie herbeiführte. Bei der Umschaltung des unpassierten Blutes auf schon passiertes (inaktiviertes) erreichte der Perfusionsdruck erst nach 5—10 Minuten wieder den Ausgangswert (Fig. 7).

Wie schon erwähnt, trat eine Inaktivierung des Vasotonins in der Niere ein. Diese Inaktivierung geschah ziemlich schnell und war oft sehr augenfällig. Abbildung 7 zeigt die Wirkung einer Einschaltung von nichtpassiertem Blut, die eine sehr ausgesprochene Wirkung entfaltetete.

Die Inaktivierung der Vasotonine durch die Niere ging auch in Gegenwart von m/1,000 KCN in derselben Weise vor sich, was darauf hinweisen könnte, dass die Inaktivierung etwa durch Filtration zustande kommen kann.

Wir haben uns davon überzeugt, dass durch Heparin ungerinnbar gemachtes Blut keinen ähnlichen vasokonstriktorischen Effekt ausübt.

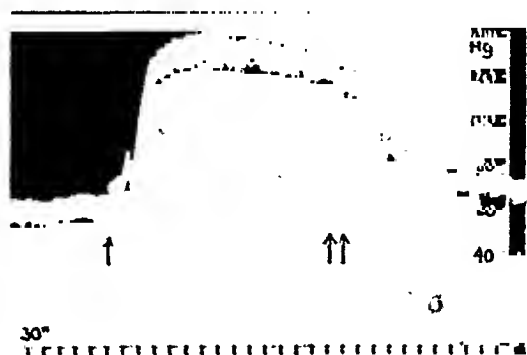


Fig. 7. Rinderniere, mit inaktiviertem Schweineblut-Ringer 1 + 1 perfundiert. Bei ↑ unpassiertes Blut eingeschaltet, bei ↑↑ inaktiviertes Blut.

### III. Beziehungen zwischen Nierenextraktwirkungen und Vasotonin.

Da die Reninpräparate ihre blutdrucksteigernde Wirkung am Gesamttier durch Erhitzen auf  $100^{\circ}$  verloren, kann das auf die Niere nach Kochen wirksame Prinzip definitionsgemäss nicht Renin sein, sondern muss entweder bei der Erhitzung aus Renin entstehen oder kommt in den Reninpräparaten schon von vornherein vor oder trifft auch beides zu. Unsere Annahme, dass diese Wirkung von einer vasotoninähnlichen Substanz hervorgerufen wurde, erhielt durch weitere Versuche eine Stütze.

Nach PAGE (1940) kann Renin den isolierten Kaninchendarm unter Umständen erregen. Wir haben diese Beobachtung bestätigen können und des weiteren festgestellt, dass diese Wirkung, wenn sie vorliegt, durch Kochen nicht verloren ging. Sie ist also nach unserer Meinung nicht als eine Reninwirkung zu charakterisieren. Prüfung unserer Vasotoninextrakte ergab nun, dass auch diese darmerregend wirkten (Fig. 8) und zwar in annähernd der gleichen Proportion wie die vasokonstriktorischen Effekte von gekochtem Renin und Vasotonin am durchströmten Nierenpräparat. Wir sehen hierin ein wichtiges Indizium für die nahe Verwandtschaft der kochbeständigen »Renin«-Wirkung und derjenigen des Vasotonins. Das Vasotonin zeigte sich bei den untersuchten pH-Bereich 4—10 ebenso kochbeständig wie die darmaktive Substanz der Reninpräparate.



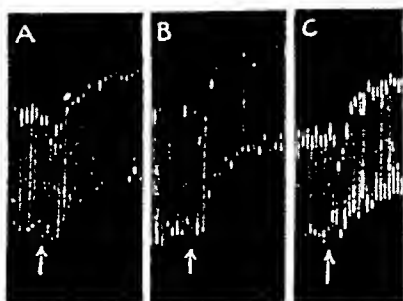


Fig. 8. Isoliertes Kaninchendarmstück. A. 1 ml Renin. B. 1 ml Renin 1 Min. gekocht. C. 0.75 ml Vasotonin.

Aus diesen Beobachtungen folgt, dass Reninpräparate — in unseren Versuchen wie in denjenigen von PAGE — eine von Renin verschiedene Substanz enthalten können, die sowohl darmerregend wie auch gefässverengernd wirkt, besonders an der Niere, was für die Analyse der Wirkung von Reninpräparaten offenbar von Belang ist. Es soll indes hervorgehoben werden, dass auch das Reaktionsprodukt des Renins, das Hypertensin, darmer-

regend wirkt und kochbeständig ist. Unsere dialysierten Renin-extrakte dürften jedoch frei von Hypertensin sein.

### Besprechung.

Unsere Untersuchungen haben zunächst gezeigt, dass Reninpräparate an gewissen Gefässbezirken vasokonstriktorisch wirken. Ein Teil dieser Wirkung geht bei Erhitzung verloren und dürfte deshalb auf das Renin selbst zurückzuführen sein. Besonders bemerkenswert schien uns die Tatsache, dass die Wirkung an der perfundierten Niere durch Kochen der Reninpräparate nicht geschwächt wurde. Der Resteffekt scheint auf einen vasotoninähnlichen Stoff zu beruhen. Die Übereinstimmung der Wirkungen von Renin, gekochtem Renin und Vasotonin am isoliertem Kaninchendarm deutet eine Wirkung ähnlicher Art an. Wenn die Annahme eines Vasotonineffektes in diesem Fall richtig ist, folgt, dass diese im Vergleich mit der Reninwirkung an der Niere sehr ausgeprägt ist. Die Durchströmungsversuche mit frisch defibriertem Blut zeigen ebenfalls eine starke Vasotoninwirkung an.

Das Vorkommen eines vasotoninähnlichen Stoffes in Reninpräparaten ist deshalb von Wichtigkeit, weil die Wirkung unter Umständen eine Reninwirkung vortäuschen kann. Besonders der Umstand, dass Vasotonin nicht dialysabel ist, lässt eine Beimengung schwerer vermeiden. Andererseits kann durch Kochen der Präparate die Reninwirkung von der Vasotoninwirkung getrennt werden. Es erhellt daraus die Notwendigkeit, die benutzten Präparate durch Hitzebehandlung zu prüfen. Nach den Anschauungen von PAGE und Mitarbeiter ist Renin bei Perfusionsversuchen

mit Ringer deshalb ohne Wirkung, weil die zur Bildung des Hypertensins notwendige Globulinfraktion des Blutes nicht vorhanden ist. Es soll aber bemerkt werden, dass wir in mehreren Fällen — sowohl an der Lunge wie am Hinterkörperpräparat — eine Vasokonstriktion durch Renin bei Perfusion mit Ringerlösung beobachtet haben, die nach Hitzebehandlung verlorenging. Die Erklärung könnte vielleicht darin liegen, dass Renin auch mit Globulinen der Gewebe oder mit Plasmaresten in den Gefäßen in Reaktion tritt, was eine Hypertensinbildung ermöglichen könnte.

### Zusammenfassung.

Reninpräparate aus Schweinenieren wirkten in Perfusionsversuchen am Hinterkörper, Lunge und Niere gefäßverengernd. Nach Inaktivierung des Renins durch Kochen bestand die Gefäßwirkung an der Niere sowie eine erregende Wirkung am isolierten Kaninchendarm, die auf einen vasotoninähnlichen Stoff zurückgeführt wird.

Vasotonin aus defibriniertem Schweineblut wirkte an Hinterkörper, Lunge, Niere und Kaninchenohr gefäßverengernd. Im Gegensatz zu Renin war intravenöse Darreichung unwirksam.

Vasotonin wird bei Perfusion durch Nieren inaktiviert, auch bei Gegenwart von  $m/1,000$  KCN.

Es wird auf die Bedeutung der Prüfung von Reninpräparaten auf Vasotoninbeimischung hingewiesen.

### Literaturverzeichnis.

- BORNSTEIN, A., Arch. exp. Path. Pharmak. 1926, 115, 367.  
 BRAUN-MENENDEZ, E., J. C. FASCILOLO, L. F. LELOIR und J. M. MUÑOZ, Rev. Soc. argent. Biol. 1939, 15, 420.  
 BRAUN-MENENDEZ, E., J. C. FASCILOLO, L. F. LELOIR und J. M. MUÑOZ, J. Physiol. 1940, 98, 283.  
 EULER, U. S. v. und T. SJÖSTRAND, Acta Physiol. Scand. 1941, 2, HELMER, O. M., und I. H. PAGE, J. Biol. chem. 1939, 127, 757.  
 HEYMANS, C., J. J. BOUCKAERT und A. MORAES, Arch. int. Pharmacodyn. 1932, 43, 468.  
 KOLSTAEDT, K. G., O. M. HELMER und I. H. PAGE, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 1938, 39, 214.  
 PAGE, I. H., Amer. J. Physiol. 1940, 130, 29.  
 PAGE, I. H. and O. M. HELMER, J. exp. Med. 1940, 71, 20.  
 TIGERSTEDT, R. und P. G. BERGMAN, Skand. Arch. Physiol. 1898, 8, 223.
-

## Post-tetanic Action Potentials in Mammalian Muscle.<sup>1</sup>

By

C. G. BERNHARD, U. S. v. EULER and C. R. SKOGLUND.

---

The single twitch after a tetanus of suitable frequency and duration regularly shows an increase in tension (GUTTMAN et al., 1937, ROSENBLUETH and MORISON, 1937, BROWN and EULER, 1938, v. PIRQUET, 1938, and others). The action potential accompanying the potentiated twitch shows a decrease of varying degree (BROWN and EULER, 1938, EULER and SWANK, 1940). Similarly the action potential of the potentiated twitch after intraarterial injections of potassium is decreased (BROWN, 1937), and it has been suggested that the potentiation of the single twitch after a tetanus is in some way associated with a liberation of potassium, which is known to occur during muscular activity (FENN, 1938, and others).

The cause of the diminution of the action potential after a tetanus is not clear. There is no evidence to show that the number of activated fibres is decreased in the post-tetanic single twitch. It would therefore appear either that the action potential of the single fibre is diminished or that some other factor comes into play which would manifest itself as a lowering of the total spike height.

In the present paper some experiments are described which have been undertaken in order to elucidate this question, by recording the action potentials in small muscle units during a single twitch after a tetanus.

---

<sup>1</sup> Received 28 April 1941.

## Methods.

The experiments were made on four cats and two rabbits, either decerebrated or anaesthetised with chloralose (0.07 g/kg) and urethane (1.75 g/kg) respectively. The tibialis anticus muscle was used in all experiments and stimulated indirectly by means of shielded silver electrodes, applied to the sciatic nerve in the thigh. The stimulating shocks were condenser discharges obtained from neon lamp stimulators and chosen to be slightly supramaximal. The tetani were of 2—5 sec duration with a frequency range of 40—100 per sec.

Action potentials were led off with concentric needle electrodes or unipolarly with small glass-shielded silver or platinum electrodes, the tip of which just emerged from the glass shield and placed in the muscle belly. In some experiments the action potential was led off by means of unshielded platinum pins in the belly and the tendon. The action potentials were amplified by a condenser-coupled 2-stage amplifier and recorded optically from a torsion band oscillograph on photographic paper. The isometric twitch tension was simultaneously recorded, the apparatus previously described (EULER and SWANK, 1940) being employed.

## Results.

In those cases where the action potential was recorded from the whole muscle by means of platinum pins in belly and tendon, a definite lowering of the potential was recorded in the single twitch after a tetanus, bearing out previous statements.

If, however, microelectrodes with points about 25  $\mu$  in diameter were used, the spike height was usually unchanged or showed slight variations in both directions. In those cases especially where the action potential was monophasic and regular (as controlled on the cathode ray oscillograph) and the movements of the microelectrode was reduced to a minimum, the height of the action potential was practically the same before and after the tetanus (Fig. 1), though there was a definite increase in twitch tension.

When electrodes of a diameter up to 100  $\mu$  were used the variations were somewhat more pronounced, but still went in both directions. Since even minute displacements of the electrodes might cause a change in the size of the potential, we interpreted the observed differences as being due chiefly to such mechanical disturbances.

In the diagram (Fig. 2) the post-tetanic action potentials are plotted as percentage values of the pre-tetanic action potential. As will be seen, the distribution is fairly even and there is no

indication of a definite change in one or the other direction. In view of the regular distribution of the action potential magnitude obtained from small groups of fibres, we conclude that the poten-

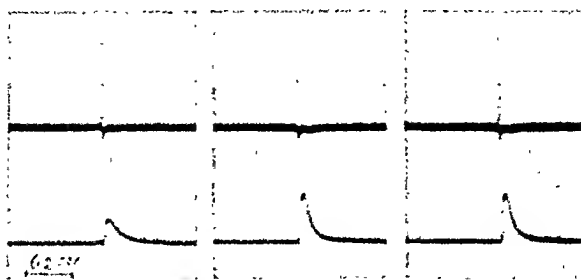


Fig. 1. Cat. Tibialis. Indirect maximal stimulation. Upper curve: Action potentials, microelectrode. Lower curve: Twitch tension. A. before tetanus, B. and C. after a 2 sec. tetanus, 50 per sec.

tial of the single muscle unit does not decrease with the total potential. On the other hand, the twitch tension is consistently increased in these cases, as illustrated in the diagram.

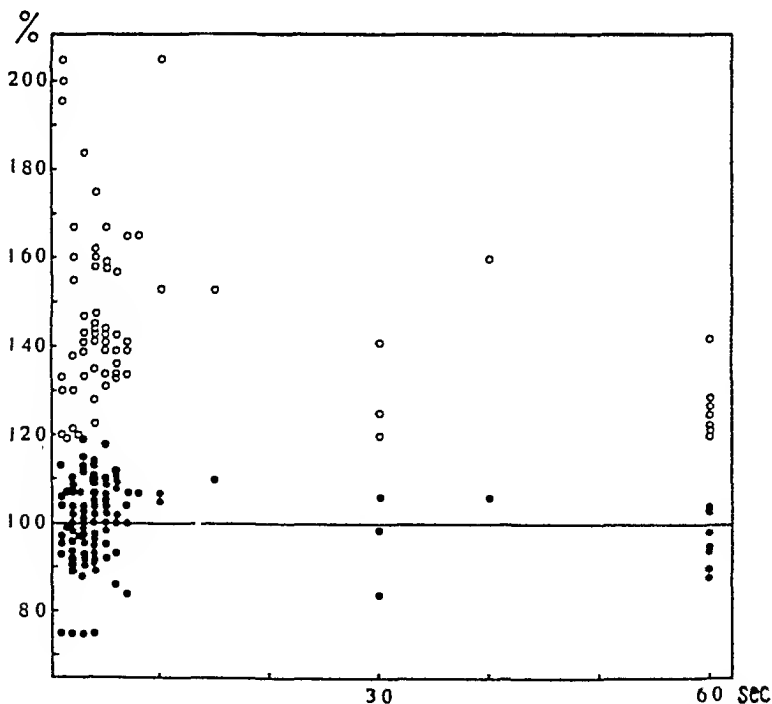


Fig. 2. Filled circles: Spike height of action potentials obtained with microelectrodes plotted as percentage values of the pre-tetanic potential (ordinate). Empty circles: Post-tetanic twitch tension as percentage values of pre-tetanic contraction. Time in seconds after end of tetanus (abscissa).

### Discussion.

The absence of any change in the action potential of small muscle units in a twitch before and after a tetanus does not necessarily involve the assumption of a reduction in the number of active fibres as a cause of the diminution of the gross action potential when recorded from the whole muscle. An increase in the temporal dispersion of the single fibre potentials would bring about a reduction in the height of the compound spike. An alteration in the total spike configuration of this kind may also be observed in the potential records concerned, though it is doubtful whether this can explain the reduction under all conditions. Another possible explanation may be found in the general depolarizing effect of a tetanus, as demonstrated by BROWN and EULER, which also occurs after an intraarterial potassium injection. This would lead to a less effective summation of the single potentials in building up the total spike, the depolarized membranes acting as internal shunts. After an intraarterial injection of potassium the depolarizing effect is accompanied by a decrease in the total action potential (BROWN). Possibly both these effects, temporal dispersion in combination with internal shunts caused by depolarization, contribute to the observed reduction in the total action potential after a tetanus, when large size electrodes are used.

### Summary.

Action potentials from small fibre units in the tibialis anticus muscle of the cat have been recorded with microelectrodes before and after an indirect tetanizing stimulation.

The action potential thus recorded showed no decrease as observed for the total potential.

The cause of the reduction in the total action potential of the post-tetanic twitch is discussed.

### References.

- BROWN, G. L., *J. Physiol.* 1937, *91*, 4 P.  
BROWN, G. L. and U. S. v. EULER, *Ibidem.* 1938, *93*, 39.  
EULER, U. S. v. and R. L. SWANK, *Acta Physiol. Scand.* 1940, *1*, 203.

FENN, W. O., Amer. J. Physiol. 1938, *124*, 213.

GUTTMAN, S. A., R. G. HORTON and D. T. WILBUR, Ibidem. 1937, *119*, 463.

PIRQUET, A. v., Pflüg. Arch. ges. Physiol. 1938, *240*, 763.

ROSENBLUETH, A. and R. S. MORISON, Amer. J. Physiol. 1937, *119*, 236.

This work has been aided by a grant from the Foundation "Therese and Johan Anderssons Minne".

---

## Evipan and the Parasympathetic Nervous System.<sup>1</sup>

By

NILS EMMELIN.

---

The research works on such barbituric acid derivatives as have found use as narcotics have in the first place naturally been concentrated upon their effects on the central nervous system. Still in some cases effects on peripheral, efferent nerves have been observed and then on nerves of cranially autonomic character.

STAVRAKY (1931) investigated in experiments on dogs the rate of the salivary secretion on stimulating the chorda tympani before and after administration of amytal (isoamylethylbarbituric acid). He found that amytal diminished the salivary secretion and that big doses totally abolished the secretion.

LIEB and MULINOS had two years earlier (1929) demonstrated a similar effect of amytal. They stimulated the cervical vagus nerve in dogs, cats and rabbits and measured the blood pressure and the pulse rate. After an injection of amytal the effect on stimulating the vagus was decreased. These experiments were confirmed by GARRY (1930) in experiments on cats and rabbits, and by SHAFER, UNDERWOOD and GAYNOR (1930) in experiments on dogs. LINEGAR, DILLE and KOPPANYI (1936) tested on dogs and rabbits besides amytal also veronal (diethylbarbituric acid), pentobarbital (ethyl (1-methylbutyl) barbituric acid) and pernoc-ton (butyl- $\beta$ -bromallyl barbituric acid). All these substances decreased the fall of the blood pressure, caused by vagus stimulation.

The same effect was studied after amytal, pentobarbital, ortal (n-hexylethyl barbituric acid) and evipan (N-methylcyclohexenyl

<sup>1</sup> Received 28 April 1941.



methyl barbituric acid) in monkeys, dogs and cats by GRUBER, GRUBER JR. and COLOSI (1938).

GRUBER, HAURY and GRUBER JR (1938) investigated the effect on the turtle heart of a great number of barbituric acid derivatives, among them also evipan. All of them decreased or abolished the effect of a stimulation of the cardiae vagus nerve — the difference between the substances being only quantitative.

In the experiments described below the effect of evipan on some parasympathetically innervated organs is studied and an attempt is made to find the site of action of evipan.

### Iris.

If evipan is injected intravenously in a cat, the pupils dilate. This effect seems to be peripheral, as a dilatation of the pupils appears also when evipan is applied locally, in the conjunctival sac.

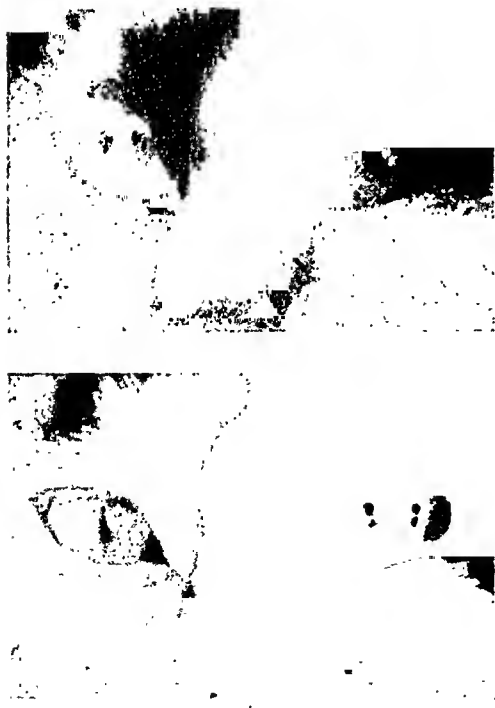


Fig. 1.

Fig. 1 shows such an experiment. The eyes of a cat were exposed to a strong light. The first picture shows that the pupils are equally wide. Some drops of a solution of 1 per cent evipan sodium in a saline solution were instilled into the left eye. The second picture was taken an hour later. At that time the left pupil was not able to contract as before, while the right one reacted normally, which proves that the effect was local and not caused by absorbed evipan.

The mydriatic effect of evipan in a 1 per cent solution can be observed 5—10 minutes after the instillation and is maximal within about half an hour. The pupil remains dilated and reacts badly on light during about 8 hours. After 12 hours the effect has totally disappeared.

The fact that the pupil after application of evipan remains dilated is probably due to the fact that evipan decreases the sensibility of the iris sphincter to the impulses in the reflexly stimulated oculomotor nerve. This idea is supported by the following experiments on the isolated m. sphincter pupillae.

The iris sphincter from an oxes eye was excised by the method of Poos (1927). The muscle was suspended in a bath containing 2 cc Tyrode's solution, which was kept at a constant temperature of 38° C. Oxygen gas was blown through the solution. The sphincter was attached to an extremely delicate lever made of a split straw, and the recording performed with the so-called point-method, used by Poos.

With this technique the lever does not touch the smoked drum. A bright light illuminates the lever and the shadow of the lever's point on the smoked drum is marked by hand from time to time with a dot.

Poos has tested some drugs affecting the autonomic nervous system on this tissue and i. a. shown that the muscle contracts on muscarine and relaxes on atropine.

In our experiments acetylcholine (Ac. Ch.) just as muscarine caused a contraction in the isolated sphincter. This agrees with the fact that the oculomotor fibres are cholinergic (ENGELHART 1931).

Fig. 2 belongs to an experiment with isolated iris sphincter. At 1 in the first part of the curve the muscle responds to 25  $\gamma$  Ac. Ch. by a marked contraction. The Ac. Ch. is then washed out with

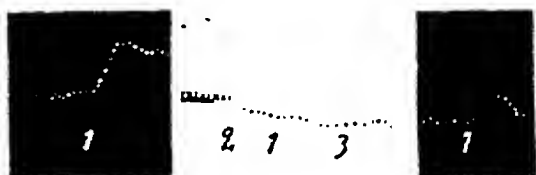


Fig. 2.

pure Tyrode's solution. At 2 evipan sodium is added in such a quantity that the concentration in the bath is 1:10 000. Evipan causes, like atropine, a relaxation of the muscle, and 25  $\gamma$  Ac. Ch. will now only give a small effect. Not even 50  $\gamma$  Ac. Ch., added at 3, cause a stronger contraction. The muscle is now washed five times with pure Tyrode's solution and after this 25  $\gamma$  Ac. Ch. will again cause a marked contraction.

In one experiment the mydriatic effect of evipan was tested in man. 1 per cent evipan sodium in a saline solution, instilled in the conjunctival sac, caused a strong transient pain. (Cats and rabbits do not seem irritated by evipan applied locally in the eye.) Four drops of evipan solution were applied in one eye. After

five minutes a dilatation of the pupil could be observed, and 15 minutes after the instillation the difference in size between the two pupils was very evident. During the whole time the reaction on light of the poisoned pupil was quite perceivable but markedly diminished. The effect persisted during about 3 hours.

The opinion that evipan affects the parasympathetic apparatus is supported by the fact that the accommodation power was somewhat diminished. The near point measured with Jaeger's letter-chart, was normally 12.5 cm. Half an hour after the instillation of evipan it was 16 cm, which corresponds to a reduction of the accommodation power with nearly two diopters.

It can hardly be expected that evipan in this experiment may interfere seriously with the accommodation power since the drug is applied in such a small amount that the resulting concentration in the deeper situated ciliar muscle cannot be but weak. In an experiment where only two drops of evipan solution were applied in the eye no effect whatever was seen on the pupil.

### The Salivary Secretion.

The experiments were performed on cats under chloralose. A glass cannula was inserted in one submaxillary duct. The amount of the outflowing saliva was registered by an electric drop recorder. The lingual nerve of the same side was cut proximally to the chorda tympani. The chorda was placed in a stimulating electrode, attached to the secondary coil of an ordinary inductorium. A solution of evipan sodium was slowly injected in a femoral vein. The blood pressure in the carotid artery was registered by a mercury manometer.

Fig. 3 shows such an experiment. At 1 the chorda is stimulated during one minute. At the mark 2 on the tracing 12 mg evipan sodium/kg body weight is injected which causes a fall in blood pressure of about 30 mm Hg. Immediately after the end of the injection the chorda is again stimulated. The salivary secretion is now markedly diminished. Already after 5 minutes the depressing effect of evipan on the secretion declines and after about 8 minutes the conditions are already normal.

A decreased salivary secretion can be demonstrated already after doses of 8 mg evipan sodium/kg body weight. A bigger dose, 20 mg/kg body weight, renders even an intense nerve stimulation ineffective. The effect of evipan is however transient even in big doses.



Fig. 3.

When evipan is injected quickly, as was the case in the experiment just mentioned, it causes a marked fall in blood pressure. The question arises whether the decrease in secretion can be ascribed to the diminished filtration pressure. This does not seem very probable. It is well known that secretion of saliva is to a great extent independent of the height of the blood pressure (ANOCHIN and ANOCHINA-IVANOVA 1929). Besides, the curve shows that the depressing effect of evipan on the secretion gradually ceases in spite of the blood pressure remaining low. After a big dose of evipan it may even occur that the blood pressure continues to fall though a stimulation of the chorda performed some minutes after the injection, may give the same amount of saliva as before the injection.

Does evipan diminish the salivary secretion also in man? If this be so, is then in a surgical narcosis with evipan the concentration big enough to produce this useful effect? In experiments where a big dose of evipan was given orally (12 mg/kg body weight) a dryness in the throat could be clearly observed. The dose which in injections will cause narcosis varies in different individuals but averages 10—16 mg/kg body weight, that is a quantity which will strongly depress the secretion of saliva in cats. This amount of evipan injected during the course of some minutes, must cause a higher concentration in the blood than 12 mg/kg body weight given orally. A depressing effect on the salivary secretion under narcosis thus seems rather likely.

### Heart.

1) *Frogs' heart.* In these experiments isolated hearts of *Rana temporaria* and *Rana esculenta* were used, beating on STRAUB'S

cannula. The cannula contained two cc. of Ringer's solution. In the experiments where parasympathetic nerve fibres were stimulated, the right vagus nerve was freed and left in connection with the heart and placed in a stimulating electrode.

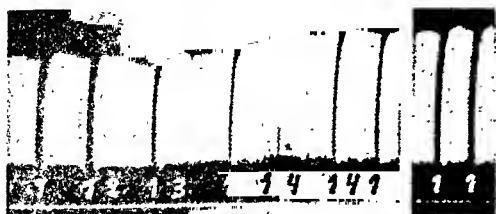


Fig. 4.

Fig. 4 shows an experiment of this kind. At the mark 1 the nerve is stimulated during 15 seconds. During two successive periods of stimulation the responses are identical. At 2 a solution of evipan sodium is added to the cannula in

such a quantity that the concentration in the cannula amounts to 1 : 100,000. When the nerve is stimulated one minute later the resulting effect is obviously smaller. At the mark 3 the concentration of evipan sodium is increased to 1 : 50,000. Two minutes afterwards a vagus stimulation is quite ineffective. At 4 the heart has been washed twice with Ringer's solution. Between the two parts of the curve five minutes have passed during which the heart was frequently washed. After this a vagus stimulation is as effective as before the application of the drug.

This experiment shows that evipan sodium lessens the effect of a vagus stimulation already in a concentration as low as 1 : 100,000. Evipan in higher concentrations will totally abolish it. The lowest effective concentration found in these experiments was 1 : 100,000. We found a definite relation between the strength of the vagus stimulus and the concentration of evipan necessary to abolish the inhibitory effect of vagus stimulation.

Such amounts of the drug which decrease the effect of a vagus stimulation do not affect the rate or the size of the heart beat. A concentration as high as 1 : 1,000 is necessary to weaken the contraction of the heart, and still higher concentrations will stop the heart in diastole.

The ventricle may however under certain conditions be affected by concentrations as low as 1 : 50,000, which will be shown in the following experiments.

A Stannius' ligature was tied around the sino-auricular junction of an isolated frog's heart. When the ventricle ceased to beat, it was made to contract through mechanical or electrical stimuli. If evipan sodium was now added the heart began to beat regularly. If after the Stannius' ligature the ventricle starts beating spontaneously, the ap-

plication of evipan sodium in a concentration of 1 : 50,000 accelerates the rate of the ventricular contractions.

The depressing effect of evipan on the irritability of the vagus ensues quickly and reaches its maximum already after 2—3 minutes. The effect is reversible. There is, however, no evidence that evipan sodium is destroyed by the frog's heart (KENNEDY and NARAYANA, 1934), but the drug is easily removed by washing.

With high concentrations of evipan it can be shown (fig. 5) that strong vagus stimulation has an effect quite contrary to the normal one. At the mark 1 evipan sodium is added, giving a concentration of 1 : 3,000 in the cannula. A weak vagus stimulation (mark 2) which before slowed the heart rate, is now ineffective. If the nerve is stronger stimulated (3), a definite increase in the height of the systolic contraction follows. This may be explained by the fact that the frog's vagus nerve contains sympathetic nerve fibres (GASKELL 1884). Having eliminated the effect of the inhibitory, parasympathetic fibres with evipan, a stimulation of the vagus nerve thus must result in an augmented systolic contraction. This effect is then identical with that produced by atropine. The sympathetic fibres in the frog's vagosympathetic nerve have been shown by LOEWI (1921) to be adrenergic. Evipan does not depress the effect of these nerves. In accordance to this, we have found in our experiments that evipan does not interfere with the effect of adrenaline, applied to the heart.

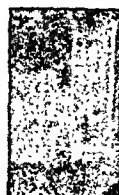


Fig. 5.

As is shown in the experiment in fig. 6 the sensibility of the frog's heart to Ac. Ch. is diminished by previous administration of evipan. At the marks 1 Ac. Ch. (0.005  $\gamma$ ) is added and causes a stoppage of the heart in diastole. The heart is washed and evipan so-

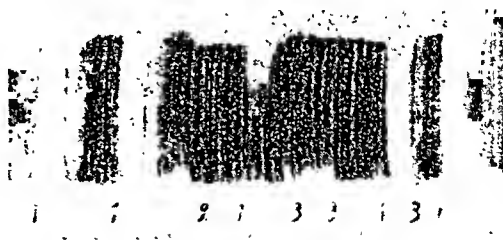


Fig. 6.

dium is added in such a quantity that the concentration in the cannula is 1 : 100,000, (mark 2). One minute later 0.005  $\gamma$  Ac. Ch. gives a considerably less inhibitory effect than before. The heart is again washed (mark 3). After three washings 0.005  $\gamma$  Ac. Ch. is just as effective as at the beginning of the experiment.



Fig. 7.

These experiments demonstrate that evipian diminishes reversibly the sensibility of the frog's heart both to vagus stimulation and to Ae. Ch. The lowest effective concentration of evipian is in both cases the same, that is about 1 : 100,000. Higher concentrations abolish the effects of big Ac. Ch. doses as well as of strong vagus stimulations.

Experiments were also made with the related compound doryl (carbaminoylcholin), which is not destroyed by the choline esterase. Evipian abolishes also in this case reversibly the depressing effect on the frog's heart of this choline ester.

## 2) *Mammalian heart.*

a) *Isolated heart.* The effect of evipian on the isolated mammalian heart was investigated on rabbit's heart in Langendorff's arrangement. Tyrode's solution at a temperature of 38° was infused through the coronary vessels under constant pressure from a cannula tied into the aorta. Ae. Ch. and evipian were injected into the perfusing cannula.

5  $\gamma$  Ac. Ch., injected during 10 sec., causes a short stoppage of the heart, (fig. 7, the first two marks 1). On the first two injections nearly similar effects are attained, (systolic stroke downwards). 1 mg evipian sodium is then injected, (mark 2), and one minute later 5  $\gamma$  Ac. Ch. The effect of Ac. Ch. is now perceptibly diminished. In order to test the constancy of the sensibility to Ac. Ch., three consecutive doses of 5  $\gamma$  Ae. Ch. are now given—at the three following marks 1. About 10 minutes after the injection of evipian 5  $\gamma$  Ac. Ch. was found to be as effective as in the beginning of the experiment, (last mark 1).

In this experiment the lowest concentration of evipian, which may diminish the effects of Ac. Ch., was not accurately determined, but the experiments show however that the isolated mammalian heart reacts on evipian in essentially the same way as the frog's heart. In both hearts the evipian can easily be washed out, whereby its effect disappears.

b) *Heart in situ.*

The experiments were performed on rabbits under morphin-urethane narcosis, on decerebrate cats, on dogs under chloralose and on guineapigs under urethane. The vagi of the heart were stimulated and the chronotrope effect registered by FLEISCH's pulse-time recorder (1930).

FLEISCH's pulse-time recorder works in the following way. A horizontal axis is driven by an invariable motor. On the axis and rotating with it, a magnet is attached. A circular iron disc, freely moving, is placed on this axis close to the magnet. The iron disc only follows the rotation of the axis when current goes through the coil of the magnet. The disc winds up a string, to which a slider is attached. The slider writes on a smoked drum. When the magnet is activated, the slider writes a vertical line on the drum. When the circuit in the magnet is opened, a spring draws the slider down to a baseline. The interruption of the current is effected by means of a special pulse magnet. When current goes through the coil of the pulse magnet, the current is opened in the circuit of the rotating magnet and consequently the slider is drawn down.

In order to record intervals between two pulse beats FLEISCH uses a pulse-pelotte, placed over an artery and connected with the same circuit as the pulse magnet. On systole the current is closed in the pulse-pelotte, thus causing the slider to fall down. By a special arrangement, attached to the pulse magnet, the current remains open in the circuit of the rotating magnet during a constant time. After this time the slider is drawn upwards and continues to rise till the next systole begins. The height of the ordinate is a measure of the interval between two pulse beats. FLEISCH calls this interval "pulse time", i. e. a reciprocal value of the pulse rate.

In our experiments we used an apparatus, constructed by dr. RUNE ELMQVIST, Lund. The action potentials of the heart are amplified by an adequate amplifier. The last stage of the amplifier is fitted with a special valve, working as a relay, which at each systole closes the current in the pulse magnet of FLEISCH's apparatus. Thus the action current of the heart operates the pulse recorder. As electrodes we used needles, inserted subcutaneously.

Fig. 8 shows an experiment performed with this technique on a decerebrate cat, respirated with a pump. The injection of evipan sodium was made in a jugular vein. Both vagi were exposed in the neck and the right vagus placed in a stimulating electrode.

At the mark 1 the left vagus nerve was cut. The lessened inhibitory tone makes the heart beat faster and the pulse time is shortened. At 2 the right vagus is cut centrally to the electrode. (The animal here made some muscle jerks which interfered with the registering, which is why the drum was stopped.) The follo-



wing section (B) shows that the pulse rate after the cutting of the right vagus is still more increased. At the signal 3 the peripheral stump of the right vagus was stimulated electrically during 5 seconds. The resulting bradycardia is well demonstrated in the lengthened pulse time. After two such stimulations 20 mg/kg body weight evipan sodium is injected — mark 4. This dose has no effect on the pulse rate. 10 minutes after this injection the nerve is again stimulated with the same strength of the current. Now the stimulus has no effect on the heart as

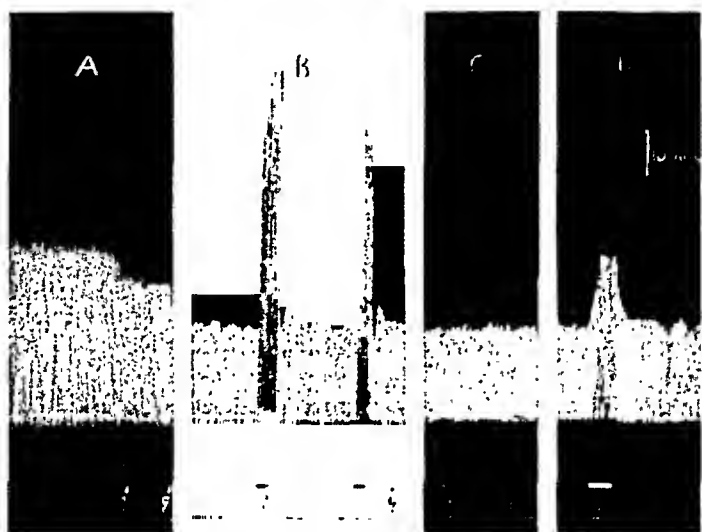


Fig. 8.

can be seen from the unaltered pulse time. At 5 a considerably stronger stimulus is applied, but even this remains ineffective. At the beginning of the last section, (D), 50 minutes have passed since the injection of evipan. At the mark 6 the vagus is again stimulated with the stronger current, applied at the signal 5; now the stimulus is effective though to a much less extent than the considerably weaker stimulus applied at 3.

In guinea-pigs the heart rate is generally too high to be registered with the technique described above. In these animals we used the following method. The chest was opened and the apex of the heart connected by a thread with a lever, registering on a smoked drum.

In the four specimens of animals experimented upon evipan sodium in doses of 10—15 mg/kg body weight definitely diminished

the effect of vagus stimulation on the heart rate. The effect appears within some minutes, persists during  $1\frac{1}{2}$ —1 hour and does not seem to disappear entirely for a couple of hours.

It is clear from fig. 8 that evipan in a dose of 20 mg/kg causes no visible changes in the heart rate when both vagi are cut. Certain barbituric acid derivatives tend to call forth an arrhythmia, (GRUBER, HAURY and GRUBER JR 1938). In our experiments and using the pulse-time recorder, we did not, although this is a very appropriate device for revealing arrhythmias, observe any kind of irregularities after injections of moderate amounts of evipan.

Evipan in moderate concentrations has no immediate toxic effect on the heart. Only extremely high concentrations weaken the beat of the isolated frog's heart. The mammalian heart was examined in the following way. A solution of evipan sodium was constantly injected into the jugular vein on decerebrate cats with cut vagi. Blood pressure and pulse rate were recorded. The first visible toxic effect was an impaired respiration. Often a strictly periodic respiration sets in, which may indicate that evipan interferes with the activity of the respiratory centres. On continued injection apnoea develops and the animal dies. The injection may be continued during a longer time if the experiment is performed with artificial respiration. Gradually the blood pressure begins to fall — the cause probably being a narcotic effect of evipan on the vaso-constrictor centre. In the pulse rate no change can be observed for a long time. But the pulse rate begins to fall quickly when the blood pressure has dropped to 30—35 mm Hg and the heart muscle, because of the diminished coronary blood flow, suffers from anoxaemia. Then the heart starts to beat arrhythmically and finally stops.

In animals with intact vagi even small doses of evipan will increase the pulse rate.

It is already known that some barbituric acid derivatives cause an effect of this kind. HAFKESBRING and MAC CALMONT (1938) demonstrated electrocardiographically on dogs and cats that veronal, amytal and nembutal increase the heart rate.

In man evipan in ordinary hypnotic doses increases the pulse rate, as is shown in fig. 9. On a subject in recumbent posture the heart rate was measured by means of a stethoscope. At the arrow 37.5 mg evipan (contained in 1.5 tabl. Evipan Bayer à 0.25 gr.) was administered orally. After about half an hour the rate had increased with some ten beats per minute. One hour and a half later the heart rate had returned to normal. The

double dose, given to the same subject, did not further increase the heart rate, but the effect persisted during a longer time.

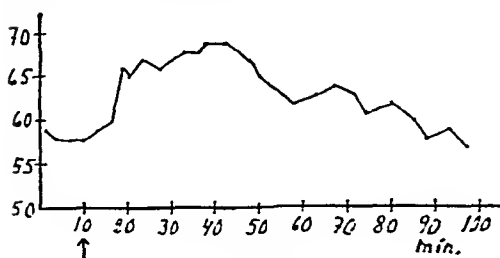


Fig. 9.

Corresponding results are to be obtained in animals provided that the vagi are intact. This effect of evipan on the heart rate is probably caused by abolishment of the tonic, inhibitory effect of the vagi.

### The Bronchi.

The bronchi receive, as has been shown by DIXON and RANSOM (1912), motor impulses in the vagal nerves, which are supposed to be cholinergic, (THORNTON 1934).



Fig. 10.

The way in which evipan alters the response of the bronchioli to vagus stimulation in cats is shown in fig. 10. The bronchiolar tone was registered with the method of KONZETT and RÖSSLER (1940).

In the method of KONZETT and RÖSSLER the animal is supplied with a tracheal cannula and respired artificially. The tracheal cannula is connected with a Starling respiration pump and with a special valve-arrangement, attached to a volume recorder. The air from the pump runs partly into the lungs and partly into the volume recording device. When the bronchioli constrict a greater amount of air enters the recording system, which is indicated by enlarged amplitudes recorded on the drum.

The bronchiolar tone is registered at the top of the figure 10. The blood pressure was measured with a mercury manometer,

connected with a femoral artery. The right vagus was excised, cut centrally and placed in a stimulating electrode. The distal stump of the right vagus was stimulated during 30 sec., (marks 1 and 2 on the figure). The curve shows that the bronchi constrict and that the blood pressure falls. 15 mg/kg body weight of evipan sodium was injected intravenously, (at 3), which caused a transient fall in blood pressure. Ten minutes later, at 4, the nerve was again stimulated and the stimulation was repeated at 5. At the mark 6 the stimulation was strongly augmented. As will be seen from this figure the bronchioli do not constrict after an injection of evipan even on very strong vagus stimulation. Further it will be seen that the fall in blood pressure, caused by vagus stimulation, is less under the influence of evipan, which may be partly due to the fact that under evipan the heart is less susceptible to the inhibitory action of the vagi.

### The Motility of the Alimentary Canal.

In the experiments described above the effect of evipan has been very similar to that of atropine. As is well known atropine produces some typical effects on the alimentary canal. Thus the stimulating effect of Ac. Ch. on the motility can be totally abolished by atropine. On the other hand the effect of vagus stimulation is only slightly diminished by atropine in spite of the fact that for example the vagus fibres to the stomach are cholinergic, as has been convincingly shown by DALE and FELDBERG (1934).

In the following experiments we have examined the way in which the motor response of the alimentary tract to vagus stimulation was altered by evipan. We experimented on the stomach of decerebrate cats. An elastic balloon was attached to the point of a gastric catheter and inserted into the stomach through the mouth. The balloon was filled with water and connected with a water manometer with a lever, writing on a smoked drum. Under artificial respiration the vagi were exposed in the chest distally to the cardiac nerves. The vagi were cut and the peripheral stumps placed in a stimulating electrode.

Such an experiment is shown in fig. 11. The spontaneous movements of the stomach are clearly seen in the curve. At the marks 1 the vagi are stimulated during 15 sec. The motor activity is markedly augmented by the stimulation. 10 mg evipan so-

dium/kg body weight is injected in the jugular vein at 2. The spontaneous motor activity is depressed after evipan. After the administration of the drug the vagi are stimulated three times at short intervals. The motor responses are now less than before. Between the parts of the curve 5 minutes have passed. The vagi are now stimulated again during three subsequent periods. The motor effect of vagus stimulation is strongly diminished. In the second part of fig. 11 the tone of the stomach is decreased under the influence of evipan. It is remarkable that if the vagi are very strongly stimulated — as at 3 — the stimulation is followed by a big fall in gastric tone.

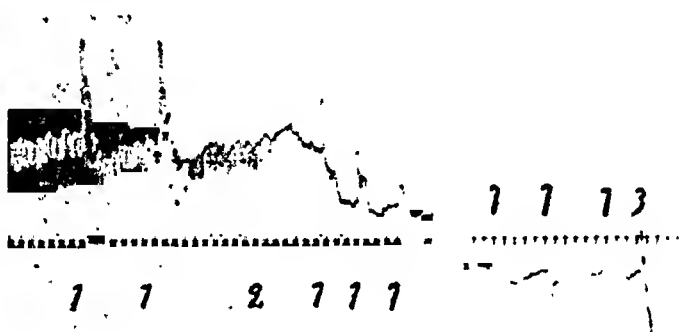


Fig. 11.

If the dose is increased to 15—20 mg evipan/kg body weight, vagus stimulation causes no increase in tone whatever, the only effect then seen is an inhibition of the tone. As has been shown by MAY (1904) the vagi contain both motor and inhibitory fibres to the stomach. Our experiments indicate that the effect of the motor fibres — but not of the inhibitory ones — is abolished by evipan. As will be seen from these experiments, the atropine-like effect of evipan on the stomach is even stronger than that of atropine itself.



Fig. 12.

Evipan also diminishes the sensitivity of the alimentary tract to the motor effect of Ac. Ch. An experiment of this kind, performed on the small intestine of a rabbit, is demonstrated in fig. 12. The pendular movements of the gut were registered by means of a frontal lever. 0.5  $\gamma$

Ac. Ch., added at the mark 1, produces the typical effects of this drug. After one minute the solution in the bath is changed to pure Tyrode's solution. At 2 evipfan sodium is added so as to give a concentration of 1:200,000 in the bath. Ac. Ch., added 2 minutes later, gives the same response as before. If however the concentration of evipfan is increased to 1:20,000 (added at 3), it almost entirely abolishes the effect of 0.5  $\gamma$  Ac. Ch.

Evipfan not only counteracts the pendular movements of the gut but inhibits also the peristaltic movements, as is shown in fig. 13. The peristalsis of guinea-pigs was registered with the method of STRAUB and VIAUD (1932).

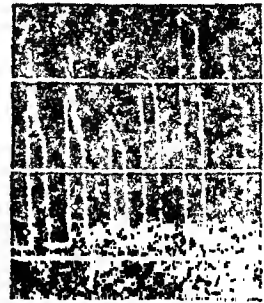



Fig. 13.

The abdomen was opened under urethane narcosis. A piece of the jejunum was ligated orally and a glass cannula inserted into the distal opening of the piece to be experimented on, leaving the circulation undisturbed. A rubber tube connects the cannula with a recording water manometer and the abdominal wall is closed around the tube. A T-tube, to which a syringe is connected, was placed between the manometer and the cannula. The whole system was filled with Tyrode's solution and the pressure in the gut fixed at zero by means of the syringe. This corresponds to the basic line of the tracing. Peristaltic movements of the gut were obtained by filling the piece of gut with Tyrode's solution from the syringe. The lowest degree of filling thus necessary to cause peristalsis was determined before and after the administration of evipfan.

In the experiment shown in fig. 13 peristalsis at first was elicited two times by the method described above. Evipfan (6 mg/kg body weight) was then injected in the jugular vein. The gut was now distended three times successively at an increasing degree. No peristalsis could be obtained. 5 minutes later the gut distension again caused a marked peristalsis.

### Uterus.

SHERIF (1935) has demonstrated the existence of motor cholinergic fibres in the uterus. Accordingly Ac. Ch. contracts the uterus muscle. This effect is antagonized by atropine, (FÜHNER 1916).



The influence of evipan on the sensitivity to Ac. Ch. was investigated on isolated uteri of rabbits and guinea-pigs. Such an experiment is recorded in fig. 14. A horn of the uterus was excised and suspended in 50 cc. Tyrode's solution. 10  $\gamma$  Ac. Ch. was added to the bath, (marks 1). The similarity of the two first responses to 10  $\gamma$  Ac. Ch. shows that the sensitivity remains constant. The Ac. Ch. is allowed to act during 2 minutes and is then washed out with Tyrode's solution. At the mark 2 evipan sodium is added in such an amount that the concentration in the bath was 1:50,000. Evipan in this concentration has no motor effect on the uterus. 2 minutes later a dose of 10  $\gamma$  Ac. Ch. was nearly ineffective. The evipan is washed out at 3 and 10  $\gamma$  Ac. Ch. again added. As is evident from the tracing, the sensitivity to Ac. Ch. returns to normal when evipan has been washed out.

Fig. 14.

### Sweat Secretion.

The secretory nerves to the sweat glands belong to the sympathetic nervous system, as has been shown by LANGLEY and ANDERSON (1891). Pharmacologically, however, these glands behave in many animals as if the secretory nerves were parasympathetic. Because of this DALE (1933) suggested that Ac. Ch. acts as transmitter at the endings of these sympathetic nerves. This assumption was brought to test and confirmed by DALE and FELDBERG (1934).

We thought it interesting to examine the effect of evipan on the sweat glands. In our experiments we used the sweat glands of the toe pads of the cat. In the decerebrate animal the sciatic nerve in one leg was exposed under artificial respiration. The nerve was placed in a stimulating electrode and cut proximally to the electrode. A solution of evipan sodium was injected in a jugular vein. The dates from such an experiment are given below.

Cat, 3.2 kg. Decerebrated at 10.30. Artificially respired. Exposure of the left sciatic nerve.

10.45 Stimulation of the nerve during 1 minute. After 15 sec. sweat drops emerge abundantly from the pad. The sweat was wiped off at the end of the stimulation.

- 10.48 The stimulation was repeated, and gave the same response.  
 10.50 30 mg evipan sodium/kg body weight injected in the external jugular vein.  
 10.52 The nerve is again stimulated. The secretion is still obvious, but diminished.  
 10.55 Stimulation. No obvious secretion.  
 10.58 Stimulation. Secretion totally abolished.  
 11.10 Stimulation is still ineffective.  
 11.15 Stimulation. A slight secretion can be observed.  
 11.20 Marked secretion on stimulation.  
 12.00 Stimulation. The secretion is still definitely less than before the injection of evipan. The animal is in good condition.

In this kind of experiment it is difficult to ascertain the smallest dose of evipan which will diminish the effect of nerve stimulation on the sweat glands, as we did not measure the secretion. 20—25 mg evipan sodium/kg body weight seem to diminish the secretion. 30—35 mg/kg body weight cause a total inhibition, which sets in some minutes after the injection of evipan and persists during 20—30 minutes. In some of our experiments observations were made up to one hour after the injection of evipan; in none of our experiments had the inhibitory effect disappeared completely within this time.

### Voluntary Muscles.

Thanks to the research works of f. ex. ZUCKER (1923), DALE and FELDBERG (1934), SIMONART (1935) and DALE, FELDBERG and VOGT (1936) it is now generally accepted that the motor nerves to the voluntary muscles are cholinergic.

It has been shown that evipan diminishes the motor response of the frog's rectus muscle to Ac. Ch., (EMMELIN 1939). In this connection we found it interesting to investigate the effect of evipan on skeletal muscles when stimulated from the nerve. Such experiments were performed on the gastrocnemius muscle of pithed frogs.

A glass cannula was tied into the abdominal aorta in caudal direction and the hind limbs were perfused with Ringer's solution. One of the gastrocnemius muscles was exposed and the tendon cut and connected with an isometric lever. The sciatic nerve on the same side was placed in a stimulating electrode and cut above.

In the experiment shown in fig. 15 the nerve was stimulated by 3 successive single shocks with an interval of 5 minutes between



each group of contractions. At the first arrow Ringer's solution is changed to a solution, containing evipan sodium in the concentration 1 : 50,000. After the second arrow the perfusion fluid contains evipan sodium in the concentration 1 : 5,000. The motor response remains unchanged. Evipan sodium even in concentrations of 1 : 3,000 was without any effect in these experiments.

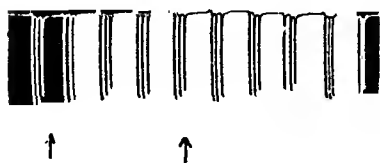


Fig. 15.

### Experiments with Compounds Related to Evipan.

In order to find out which group of atoms in the evipan molecule that is responsible for the effects, described above, we experimented also with some related barbituric acid derivatives.

The experiments were performed on the isolated frog's heart. The lowest concentrations in which these compounds obviously inhibit the effect of Ac. Ch. on the heart, were compared. We investigated the following substances: luminal, phanodorm, prominal and evipan.

From the point of view of the constitution evipan (*N*-methylcyclohexenyl methyl barbituric acid) can be derived from luminal (phenylethylbarbituric acid). Phanodorm (cyclohexenyl ethyl barbituric acid) differs from luminal in that two double bonds have been hydrogenated in the benzene nucleus. Prominal (*N*-methylphenyl ethyl barbituric acid) is *N*-methylated luminal. Phanodorm and prominal may thus be regarded as intermediate between luminal and evipan.

We have found that all these substances excited qualitatively similar effects on the frog's heart, but the degree of action differed. The lowest concentration of luminal, which definitely diminishes the sensitivity to Ac. Ch. of the frog's heart is 1 : 2,000; the corresponding concentration for phanodorm is about the same. As has been mentioned above, evipan is effective already in the concentration 1 : 100,000. Prominal was found to be effective in doses of about the same order.

It seems as if the disappearance of two double bonds in the benzene nucleus does not change the inhibitory effect of the compound, whereas on the other hand the introduction of a methyl group at one of the nitrogene atoms of the carbamido-group should cause an essential increase in this effect.

In order to test this assumption experiments were made with two other barbituric acid derivatives, noctal (isopropyl bromallyl barbituric acid) and the related N-methylated compound eunarcon. Both substances, and especially eunarcon, weaken already in low concentrations the heart beat, thus complicating the experiments. This effect was marked already in concentrations of 1 : 20,000. In this concentration noctal did not alter the sensitivity to Ac. Ch., whereas eunarcon markedly depressed the sensitivity.

### Discussion.

Evipan diminishes the effects caused by stimulating the parasympathetic nerves. Contrary to the wellknown narcotic effect of evipan, the effect here studied is evidently peripheral. This effect is thus obtained even when the nerve is stimulated after having been cut above the electrode. It can also be demonstrated in isolated organs.

Under the aspect here discussed DALE's term "cholinergic" is more adequate than the anatomical "parasympathetic", as the effects described are not limited to parasympathetic nerves. Evipan affects f. ex. the secretion of sweat in the cat's toe pads, which is stimulated by sympathetic fibres of cholinergic nature. The effects of the sympathetic, adrenergic fibres in the cardiac vagus of the frog, however are not depressed by evipan. Neither is the sensitivity of the frog's heart to adrenaline affected by evipan.

LINEGAR, DILLE and KOPPANYI (1936) have shown that the effect of vagus stimulation on the blood pressure is diminished by injections of some barbituric acid derivatives. They localize the site of action of these compounds to the synapse between prae- and postganglionic neurons. Our experiments suggest that the effect of evipan is even more peripheral. It is true that in our experiments the praeganglionic fibres were stimulated. It is also difficult to exclude completely the possibility that evipan acts on the synapse in such a way that this structure is rendered less sensitive to added Ac. Ch. Apart from this possibility, which we did not try to exclude experimentally, we have demonstrated conclusively a more peripheral site of action of evipan.

1) As is well known Ac. Ch. acts also on structures peripheral to the postganglionic nerve endings. If the inhibitory effect of evipan was localized only to the synapse, a complete abolishment of the effect of added Ac. Ch. would be impossible. As can be

seen from our experiments, however, even big doses of Ac. Ch. are quite ineffective if the concentration of evipan is sufficiently high.

2) Evipan diminishes the sensitivity of the isolated pupillary sphincter to Ac. Ch., although there is no synapse in this tissue. Contrary to what is generally the case in the parasympathetic nervous system this synapse is not situated close to the effector organ, but in the ciliar ganglion.

3) In the investigations of the sweat glands of the cat's toe pad the postganglionic nerves are stimulated — the secretory fibres in the sciatic nerve being postganglionic. In spite of this evipan inhibits the secretion.

As an argument contradictory to the assumption that evipan acts on the synapse it may be pointed out that evipan does not interfere with the irritability of the frog's gastrocnemius muscle when stimulated from the nerve. The striking resemblance in the response to drugs between the synapses in the autonomic nervous system and the neuromuscular junction of skeletal muscles has often been emphasized, (GADDUM 1936, CANNON and ROSENBLUETH 1937).

These arguments suggest that evipan acts peripherally to the synapse between prae- and postganglionic neurons. We have not examined if evipan acts through inhibiting the liberation of the chemical transmitter at the endings of the postganglionic nerves. The fact that evipan abolishes the effect of added Ac. Ch. suggests that evipan renders the effector cells insensitive to that chemical transmitter in the same way as atropine, which does not interfere with the liberation of the transmitter, (LOEWI and NAVRATIL 1934).

It is not likely that evipan has a direct inhibitory effect on the effector cells, as the effect is only obtained in cholinergically controlled organs. Evipan diminishes the effect of nerve stimulation or of the added Ac. Ch. quite independent of the nerves being inhibitory or motor. There is nothing so far to contradict the assumption that evipan acts on the specific receptor system which, according to LANGLEY (1905), transfers the impulse in autonomic nerves to the effector cells.

The inhibitory effect of luminal is much less than that of evipan. If luminal is transformed into phanodorm by hydrogenating two of the double bonds of the benzene nucleus, the effect is not augmented. Through N-methylation of luminal however, a compound is obtained, prominal, which is about as effective as evipan.

The question remains to be answered what these changes mean from a physico-chemical point of view. A more advanced knowledge of these matters would perhaps be useful for the understanding of the mode of action of evipan.

### Summary.

The action of evipan is not limited to the central nervous system. Evipan acts also on peripheral structures. These effects are very similar to those caused by atropine. Evipan diminishes the responses obtained through stimulation of cholinergic nerves. It also counteracts the muscarine-like effects of Ac. Ch.

On instillation of evipan in the eye a mydriatic effect is obtained. The drug depresses the sensitivity of the isolated iris sphincter to Ac. Ch. The salivary secretion, elicited on stimulation of the chorda tympani, is less under the influence of evipan. Evipan increases the heart rate, which effect is not seen when the vagi are cut. The sensitivity of the heart to vagus stimulation and to Ac. Ch. is also depressed. The bronchiolar constriction on vagus stimulation is diminished. Evipan is more effective than atropine in decreasing the motor responses of the stomach to vagus stimulation. The drug also renders preparations of isolated intestine and of uterus less sensitive to Ac. Ch. On administration of evipan the sweat secretion on the cat's toe pad on stimulation of the secretory nerves is diminished.

We suggest that also other barbituric acid derivatives exert similar effects; experiments on isolated frog's heart point to such a possibility. The superiority of evipan in producing such effects may be due to its so-called N-methylation.

### References.

- ANOCHIN, P. and A. ANOCHINA-IVANOVA, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1929. 222. 478.  
 CANNON, W. B. and A. ROSENBLUETH, *Autonomic neuroeffector systems.* New York 1937.  
 DALE, H. H., *J. Physiol.* 1933. 80. 10.  
 DALE, H. H. and W. FELDBERG, *Ibidem* 1934. 81. 39. 40. 320.  
 DALE, H. H., W. FELDBERG and M. VOGT, *Ibidem* 1936. 86. 353.  
 DIXON, W. E. and F. RANSOM, *Ibidem* 1912. 45. 413.  
 EMMELIN, N., *Skand. Arch. Physiol.* 1939. 83. 69.  
 ENGELHART, E., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1931. 227. 220.

- FLEISCH, A., *Z. ges. exp. Med.* 1930. 72. 384.  
FÜHNER, H., *Biochem. Z.* 1916. 76. 232.  
GADDUM, J. H., *Gefässerweiternde Stoffe der Gewebe.* Leipzig 1936.  
GARRY, R. C., *J. Physiol.* 1930. 69. 12.  
GASKELL, W. H., *Ibidem* 1884. 5. 46.  
GRUBER, C. M., C. M. GRUBER JR and N. A. COLOSI, *J. Pharmacol.* 1938. 63. 215.  
GRUBER, C. M., V. G. HAURY and C. M. GRUBER JR. *Ibidem* 1938. 63. 193. 229.  
HAFKESBRING, R. and M. CALMONT, *Ibidem* 1938. 64. 43.  
KENNEDY, W. P. and B. NARAYANA, *Quart. J. exp. Physiol.* 1934. 24. 69.  
KONZETT, H. and R. RÖSSLER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1940. 195. 71.  
LANGLEY, J. N., *J. Physiol.* 1905. 33. 374.  
LANGLEY, J. N. and H. K. ANDERSON, *Ibidem* 1891. 12. 347.  
LIEB, C. C. and M. G. MULINOS, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1929. 26. 709.  
LINEGAR, C. R., J. M. DILLE and T. KOPPANYI, *J. Pharmacol.* 1936. 58. 128.  
LOEWI, O., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1921. 189. 239. and 193. 201.  
LOEWI, O. and E. NAVRATIL, *Ibidem* 1924. 206. 123.  
MAY, W. P., *J. Physiol.* 1904. 31. 260.  
POOS, F., *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1927. 126. 307.  
SHAFER, G. D., F. J. UNDERWOOD and E. P. GAYNOR, *Amer. J. Physiol.* 1930. 91. 461.  
SHERIF, M. A. F., *J. Physiol.* 1935. 85. 298.  
SIMONART, A., *Arch. int. Pharmacodyn.* 1935. 51. 381.  
STAVRAKY, G. W., *J. Pharmacol.* 1931. 43. 499.  
STRAUB, W. and P. VIAUD, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1932. 169. 18.  
THORNTON, J. W., *J. Physiol.* 1934. 82. 14.  
ZUCKER, K., *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1923. 96. 29.
-

From the Institute of Theoretical Physics, Copenhagen.

# A Geiger Counter Arrangement Applied to Measurements of Radioactive Indicators in Biological Research.<sup>1</sup>

By

HILDE LEVI.

---

In the application of radioactive indicators to biological research one is often faced with the problem of the determination of minute activities. Such activities can conveniently be measured by aid of a Geiger-Müller counting tube. Numerous types of Geiger counter arrangements are known which are used by the physicist for the investigation of the properties of radioactive and other radiations, for the decay of radioactive substances, and so on. In the present paper, a Geiger-Müller counter arrangement is described which was used in the last six years for the biological work carried out at the Institute of Theoretical Physics, Copenhagen (HEVESY 1940). The application of radioactive indicators mostly involves the task to compare the activity of various samples. The radioactive indicator is administered, for example, to an animal and we have to determine what percentage of the activity administered is present in different fractions extracted from the tissue. Such comparisons can conveniently be carried out by means of the arrangement described in the following.

## Principle of a Geiger-Müller Counting Tube.

The principle of a GEIGER-MÜLLER counter suited for the measurement of  $\beta$ -particles is, briefly, the following:

Received 5 May 1941.

A metal tube is tightly closed at the ends by means of insulating plugs and a thin metal wire is stretched along its axis. The tube is filled with a suitable gas mixture to a pressure of about 10 cm. of Hg. The tube itself is connected with the negative terminal of a source of e. m. f. of 1,000—1,500 V. and the wire is connected with the positive terminal through a high resistance. A  $\beta$ -particle passing the wall of the tube (or a window in the wall if the latter is too thick) is forming ions on its path and is thus giving rise to a discharge in the tube which may be observed by means of an electrometer or an amplifier system. In this way we are enabled to register every individual  $\beta$ -particle which enters the counter tube. (For further literature comp. GEIGER, MAKOWER and GEIGER 1912, THIBAUD 1938.)

#### *The shape of the counter.*

The counter is made from a brass block,  $3 \times 3 \times 6$  cm., by drilling a hole lengthwise through the block 6 mm. off centre in one direction and symmetrical to both sides.

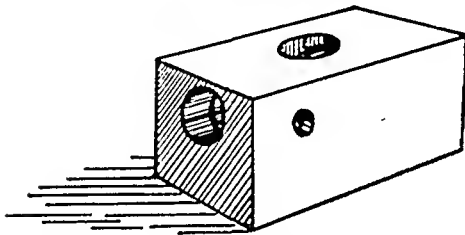


Fig. 1. The shape of the counter.

The hole is 12 mm. in diameter and is enlarged to 14 mm. at both ends to a depth of 1 cm. for the insulating plugs. The long face of the block nearest the hole is drilled for a window, 11 mm. in diameter, symmetrically placed. On one of the adjoining faces of the block is

inserted a side tube for pumping and filling. The diameter of this tube is 6 mm.

#### *The window.*

The windows used in most cases are thin mica sheets of a thickness corresponding to 6 mgm/cm<sup>2</sup>. The mica is split off from thick stock in the usual manner by pushing a sharp edge of thin paper in between two layers of the mica. The minimum thickness of the window is given by the fact that the counter must be evacuated: mica windows of the present size, weighing less than 4 mgm/cm<sup>2</sup>, cannot stand atmospheric pressure. On the other hand, if the window is too thick, it will markedly absorb the  $\beta$ -rays emitted from the radioactive substance to be measured; the absorption due to a 6 mgm/cm<sup>2</sup> window amounts to less than 10 per cent of the initial intensity.

From a mica plate of the correct thickness a circular piece, 25 mm. in diameter, is cut by means of a sharp needle around the edge of a coin. In order to make the window electrically conducting it is cleaned with alcohol and painted with "Aquadag", i. e. "Colloidal Graphite (in water) Concentrated, Acheson Ltd., London". For convenience of sealing of the mica window it is necessary to leave the outer 2 or 3 mm. free from graphite.

*The end pieces.*

The insulating plugs in these counters are always made of amber and not of ebonite in spite of the fact that the insulation of ebonite is sufficiently good. The choice of material of these end-pieces is determined by the gas which is used for filling the counter. In the case of air-filled or hydrogen-filled counters, ebonite end-pieces are completely satisfactory while, in case of organic filling gases, amber end-pieces should be preferred because of their greater resistibility. The filling of the counter will be described in a later paragraph (p. 314). The plugs are 7 mm. long and fit well in the bored-out ends of the counter. A 0.8 mm. hole is drilled through the centre of each plug for the counter wire and is enlarged to 2 mm. to a depth of about 3 mm. on the inside face. A glass tube, 1 cm. long, is pressed into the 2 mm. hole and serves to shield the counter wire and to shorten its effective length. The counting length of the wire is, thus, only about 2 cm., which reduces the "natural effect" very markedly. The end surfaces of the plugs should be polished carefully in order to insure good insulation.

*The wire.*

One of the most important steps in the construction of a counter is the preparation of the wire. The wires used in these counters are of steel,  $\frac{1}{10}$  mm. in diameter. A piece of suitable length is stretched between two supports and is inspected for irregularities by passing it between finger and thumb; only very smooth pieces can be used. In order to protect the prepared wire against dust and contamination from the fingers a thin glass capillary (less than 0.8 mm. in diameter!) is slipped over one half of the stretched wire, and the other half is cleaned with the finest grade of emery paper until it is shiny, washed with alcohol and then oxidized very slowly by heating in air with an electric current of about 1.2 amps. until it looks uniformly blue. The glass capillary is slipped over the cleaned part of the wire which is cut free from the supports and can now easily be handled and mounted in the counter without being touched.

*The assembly of the counter.*

When the brass block, the plugs, the wire, and the window are prepared, the counter should be assembled at once. It is important to keep all parts of the counter free from dirt and dust particles since one of the most frequent defects which occur in counters is the discharges which take place between dust particles on the wall and the wire. Such discharging counters are completely useless. The assembly should therefore take place on a piece of plain paper or glass and in a relatively dust-free room.

Shortly before mounting, the brass block is polished with fine emery paper and washed carefully with alcohol. It is then heated slowly on an asbestos plate with a Bunsen burner until ordinary picein-wax will flow. If the metal is too hot, the picein will carbonize. A ring of picein is painted around the window hole of the brass block with



an outer diameter somewhat larger than the mica disk. The edge of the hole should be left free in order to facilitate electrical contact with the graphite. The mica window is now placed on the waxed surface and carefully pressed down. The edge of the mica disk must be covered with a small ring of picein wax in order to make the sealing of the window vacuum-tight. While the block is cooling down the glass side tube for the evacuation is sealed into its hole with picein. It is not difficult to seal the glass tube from the side if it is supported until the block is cooled down.

TROST (1937) has shown that counters are more uniform and more constant in their electrical properties if their walls are covered with a very thin layer of Zapon lacquer. A very thin solution containing 2 cc. lacquer in 200 cc. pure amyl acetate sprayed on the inside wall of the counter (after mounting the window and the glass tube!) will leave a very thin skin of lacquer after evaporation of the amyl acetate. Before the counter is quite dry, the cleaned amber plugs are inserted and the capillary with the wire is put through both end-pieces. The wire is fastened on one end by wedging a small pin in the 0.8 mm. hole. The capillary is then removed through the other end, the wire is stretched slightly and fastened with a pin. After having mounted the wire one should leave the counter for a while so that dust particles, which in spite of all care might find their way into the counter, will settle down and stick on the not yet dried lacquer near the end-pieces of the counter. A thin copper wire is then soldered to one of the pins for electrical connection and the plugs are sealed with hot Everett's vacuum wax. Since the wax does not make a perfect contact with the cold brass block, it is necessary to shellac it. The copper wire must be handled carefully in order to avoid breaking the seal.

#### *The gas-filling.*

A number of gases may be used in Geiger-Müller counters which, for example, can very well be filled with dry, dust-free air to a pressure of about 10 to 12 cm. of Hg. Hydrogen filling has very often been applied also, but the counters should in this case be filled to a somewhat higher pressure, 12 to 15 cm. of Hg approximately. TROST (1937) has carried out a detailed work on the question of filling with various gases and on the influence of pressure and contamination on the properties of counters. In application of one of TROST's results, the counters described above were filled with argon to a pressure of 9 cm. and alcohol vapour to a pressure of 1 cm. The alcohol (99.5 per cent) was distilled over calcium.

The arrangement for the evacuation and filling of the counters is made of ordinary soft glass and consists of a horizontal tube with six side-tubes which is mounted 2 cm. above the table so that the counters can be sealed on to it directly. The tube is connected by means of a Tee on one side to a manometer, a liquid air trap, and an oil pump; on the other side there is the flask containing argon gas at atmospheric pressure, and the alcohol container. The argon flask carries a gas-lock consisting of two cocks so that filling to the right

pressure is done by letting small amounts of the gas through the lock into the apparatus. The alcohol tube is connected to the apparatus by means of a ground joint and is closed by a cock. It is advisable to provide a cock for each counter so that its vacuum tightness can be tested independently of the others. The counter is sealed to its side-tube by means of piecin and is pumped for at least two hours. If it appears that the counter is quite tight, it is left evacuated over night while a Dewar bottle with liquid air or solid carbon dioxide is put around the trap to freeze out all water vapour and laequer solvents, etc. Before the counter is filled it is closed from the liquid air trap and the trap is warmed up and pumped out. The alcohol vapour is let in first to a pressure of 1 cm. of Hg and afterwards the argon to a total pressure of 10 cm. of Hg. At last, the counter side-tube is sealed off carefully with a small flame.

### *The lead shielding.*

The sealed counter is shielded against ionizing radiation by lead surrounding the counter on all sides with a thickness of at least 4 cm. By means of the lead shielding the "natural effect" of the counter is reduced by 30 to 50 per cent. The ionizing radiation is partly of cosmic origin and is partly emitted by radioactive substances accumulating on the walls of the room, etc. It is mainly due to this ionizing radiation that some impulses are registered by the counter even in absence of a radioactive sample. The counters described above showed a "natural effect" of between 3 and 4.5 impulses per minute.

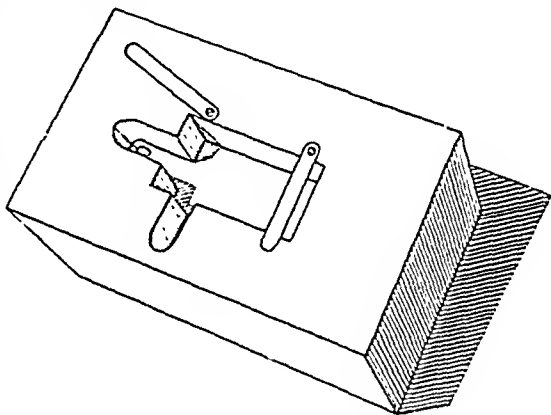


Fig. 2. The lead shielding of the counter.

The shielding consists of two lead blocks  $17 \times 10 \times 7$  and  $17 \times 10 \times 5$  cm., respectively. The thicker block is hollowed out to correspond to the shape of the counter. Sufficient space is provided for the side-tube and the electrical connections to allow handling without danger of breaking the seals. The counter is fastened inside the block by pinching it to the wall with aluminium foil which, at the same time, makes a satisfactory electrical contact. The block itself is used as one terminal of the high voltage. The copper wire is led out of the block through a hole and is supported by two amber plugs which are drilled with 0.3 mm. holes. It is of greatest importance to have good insulation between the block and the wire; the amber plugs must be kept clean and there must be plenty of clearance around the wire.

The thinner block is provided with a groove,  $2.5 \times 6$  cm<sup>2</sup> and 4 mm. deep, for a slide which carries the sample to be measured. The slide and groove are so arranged as to insure the placing of the sample in a symmetrical and reproduceable position in front of the counter window. For convenience in handling samples, the thick block is turned so that the counter window is down. The two blocks are bolted together and are provided with handles.

### The amplifier.

Many different types of amplifiers have been described in various papers from the field of radioactive measurements, but it would lead beyond the scope of this paper to give any full discussion of the question (cp. BJERGE 1938, NEHER and HARPER 1936, RUARK 1938). It will suffice to describe an amplifier which because of its reliability has been much used in connection with the counters described above. Figure 3 is a schematic diagram of the circuit.

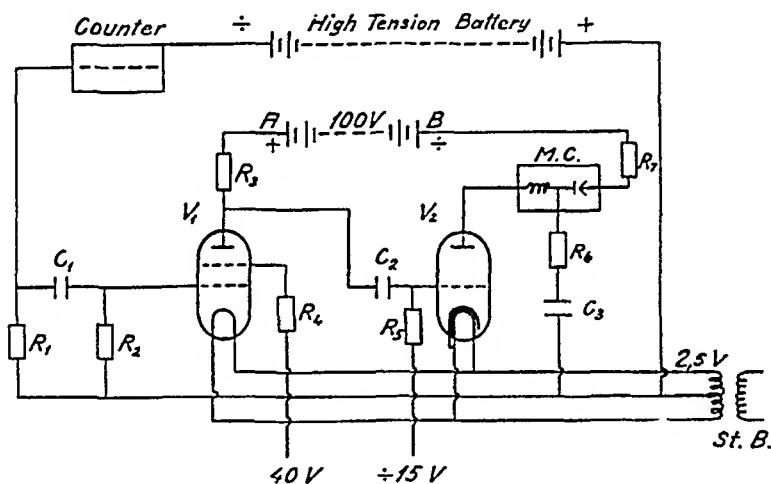


Fig. 3. The amplifier circuit.

$C_1 = 50$  cm;  $C_2 = 500$  cm;  $C_3 = 0.5$  MF.

$R_1 = 10^9 - 10^7 \Omega$ ;  $R_2 = 10^7 \Omega$ ;  $R_3 = 10^5 \Omega$ ;  $R_4 = 3 \times 10^4 \Omega$ ;  $R_5 = 5 \times 10^3 \Omega$ ;

$R_6 = 300 \Omega$ ;  $R_7 = 3,000 \Omega$ ;

$V_1 =$  R. C. A. 57 (or 58) American tube, or E 442, Philips, European tube.

$V_2 =$  R. C. A. 885 (American thyratron) or G. E. C. gas filled relay, (English).

$R_1$ , a resistance of  $10^9$  ohms, is made in the usual way from a mixture of xylol and alcohol. In the case of alcohol filled counters, it was found that the  $10^9$  ohms resistance may be replaced by a  $10^7$  ohms resistance which is available commercially. *M. C.* is a standard telephone message register provided with a breaking contact which serves to quench the thyratron discharge after the count has been registered. Such message registers are supplied by the Telephone Company "Automatic", Copenhagen. It is important to use a high speed register to avoid losing counts. The one used here has a maximum speed of about 3,000 (evenly spaced) pulses per minute. The number of impulses in a certain time interval can be read directly.

*H. T.* is the high tension battery consisting of ten to fourteen 108 V. batteries in series which are provided with plug-in terminals at 3 to 5 V. steps. The counters described above counted at about 1100—1200 V.; the batteries are stacked in columns and insulated from one another by paraffined paper. There is a protecting resistance of 1 M $\Omega$  in the high circuit. The battery set must be kept in good condition and should be tested from time to time by means of a voltmeter and an artificial load of about 3,000 ohms. The drop of potential under load should not be greater than 10 per cent; an excessive drop of potential in a battery can often be repaired by shorting out a few bad cells.

*A. B.* The anode voltage and the grid voltage are taken from a 108 V. high-capacity dry battery. (Hellesen's Dry Battery.)

*St. B.* The heater current is taken either from a storage battery or a transformer which give 4 V. or 2.5 V., respectively.

In order to inhibit external electrical disturbance of the amplifier system, the connection between the counter and the resistance  $R_1$  of the circuit is kept as short as possible by mounting the amplifier on top of the lead block containing the counter. Besides, the amplifier itself is shielded by a tin box which is earthed. The tin box is insulated from the lead block (which is at high potential!) by an ebonite plate. It is necessary to provide ventilation holes in the tin box to avoid overheating of the amplifier.

#### *The testing of the counter.*

The counting properties of a counter are tested by means of a uranium salt (1 mgm. of uranium oxide covered by a 1 mm. layer of wax). The number of impulses per minute registered as a function of the voltage on the Geiger-Müller counter follows a curve like that shown in Fig. 4.

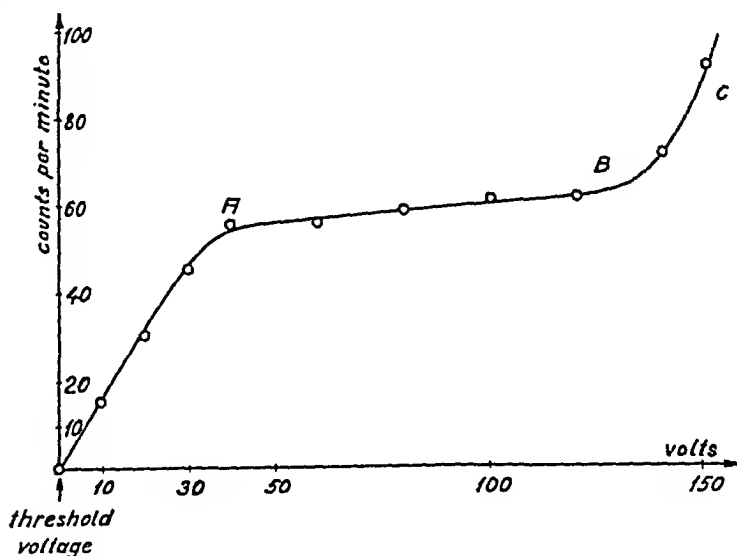


Fig. 4. Characteristic curve of a counting tube.

With increasing voltage the number of registered counts per minute increases until a range A-B is reached, where the counter sensitivity is more or less independent of the voltage. In the range A-B of the curve the change in the number of counts is less than 10 per cent if the voltage varies by 10 per cent of its value. This so-called flat part of the characteristic curve is, in the above described counters, usually 60—100 V. broad and starts about 20—30 V. from the point at which the counter begins to count (threshold voltage). With still further increase of potential — range C — the number of impulses increases rapidly until the counter starts continuous discharging.

When testing a Geiger-Müller counter one must determine the flat part of the characteristic curve since it is desirable to use the counter for regular measurements in that range where possible fluctuations of the voltage have a minimum effect on the counting rate. As the counting properties of a counter are not constant with time, it is of the greatest importance to check this curve several times in the course of the first few days after the filling of the counter. When the counter seems to have become stable it is sufficient to check the curve occasionally. It is, however, necessary to test every day whether the counter is still counting on the flat part of its characteristic curve. A useful test consists in determining the number of impulses per minute from a uranium standard at the working voltage. A change in the number of impulses from this standard sample indicates a change either in the voltage supply or in the properties of the counter. Furthermore, it is very useful to determine the threshold voltage. In general, the difference between this voltage and the middle of the flat part of the characteristic curve will not vary essentially. By this double control, one may avoid the possibility that the sensitivity of the counter gradually slips down to a point below the flat part of the curve.

### The Measuring Procedure.

The radioactive samples to be measured are filled into small aluminium dishes, 12 mm. in diameter and 2 mm. deep. The dishes are punched out of an 90—100  $\mu$  aluminium foil and fit accurately into the hole of the slide. Every dish is used for one sample only, in order to avoid carrying along traces of previous activity. When the powdered and dried material is filled into the dishes, great stress should be laid upon attaining a uniform layer which covers the whole inner surface of the dish.

For comparative measurements of different preparations, special regard should be paid to two important points: the geometrical comparability and the relative accuracy of the measurements. Part of the first point is connected with the absorption in the upper layers of the sample of the  $\beta$ -rays emitted from deeper layers. This effect may be demonstrated by the follow-

ing example. The same amount of radioactive phosphorus is mixed to increasing amounts of inactive sodium phosphate and the activities of the samples are compared. These activities decrease with increasing amounts of carrier substance, as is to be seen from the following figures.

Amount of sodium phosphate	Measured intensity of the radiation
50 mgm	1
100 "	0.97
150 "	0.92
200 "	0.87
250 "	0.79
300 "	0.72

The figures of the table indicate that it is necessary for the direct comparison of samples to apply equal quantities of material.

The comparison of samples weighing 70—100 mgm. was found to be very convenient. When active phosphorus is to be determined in ammonium magnesium phosphate preparations, such samples can be obtained by bringing up the weight of the lighter samples to that of the heavier ones by adding a corresponding amount of phosphate. When blood samples of different weight have to be compared, non-active blood is added to the lighter samples (HEVESY and HAHN 1940). In such rare cases where the comparison of samples of equal weight is not feasible the values measured are corrected according to the figures given in the above table or similar ones, the correction getting much larger when the activity of substances emitting softer rays is determined.

Part of the second point is an estimation of the statistical error involved in the activity determinations. The mean error  $\Delta N_c$  of a value of  $N_c$  impulses per minute measured through a period of time  $t$  (in minutes) is given by the formula

$$\Delta N_c = \frac{\sqrt{\text{number of impulses}}}{t}$$

It is obvious that strong preparations can be measured with satisfactory accuracy within a suitable time and, furthermore, without the background of the counter (the natural effect) playing any important part. If, however, weak preparations are to be compared with strong ones the relative accuracy of the mea-

surements must be taken into account. The following example may illustrate this fact. A weak sample of about 2 counts per minute net (i. e. after subtraction of the natural effect) is measured relatively to a standard sample of about 80 counts per minute net. The natural effect may amount to 3 counts per minute when measuring an empty clean aluminium dish. These three magnitudes were measured three times and altogether three hours each. We arrive at the following figures:

Natural effect:	551 counts in 180 minutes
Weak sample:	909 counts in 180 minutes
Strong sample:	14958 counts in 180 minutes.

The accuracy of the measurements is, thus,

$$\text{Natural effect: } 3.06 \pm \frac{\sqrt{551}}{180} = 3.06 \pm 0.13$$

$$\text{Weak sample: } 5.05 \pm \frac{\sqrt{909}}{180} - 3.06 \pm 0.13 = 2 \pm 0.3$$

$$\text{Strong sample: } 83.0 \pm \frac{\sqrt{14958}}{180} - 3.06 \pm 0.13 = 80 \pm 0.9.$$

The accuracy reached for the strong sample is, thus, very much better, i. e. about 1 per cent, than that of the weak sample which is only about 15 per cent.

### The Correction for the Resolving Power of the Amplifier System.

When measuring strongly active preparations the mechanical resolving power of the amplifier system, especially of the mechanical register, may become of some importance for the final result. The registers applied in the present arrangement had a maximum speed of 3,000 evenly spaced impulses per minute. However, doublet- and triplet-impulses may occur which cannot be resolved by the system and which, therefore, get lost in the registration. A very simple method of checking the resolving power is the measurement of a decay curve from a radioactive substance with a well-known and convenient half-life period. A few milligrams of dysprosium oxide are exposed to a

*Comparison of two ammonium magnesium phosphate samples  
containing radioactive P.*

(Weight: 72 mgm).

Samples	Min-utes	Read-ings	Activity per minute	Time
Uranium standard . . . . .	0 25	3755 5411	} 1656 : 25 = 66.2	9 <sup>15</sup>
Bone sample A . . . . .	0	5477	} 2435 : 30 = 81.2	9 <sup>51</sup>
	30	7912		
	44	9057	3580 : 44 = 81.2	
Blood sample . . . . .	0	0033	} 1032 : 60 = 17.2	10 <sup>38</sup>
	60	1065		
	122	2110	2077 : 122 = 17.0	
Natural effect . . . . .	0	2133	} 438 : 120 = 3.6	11 <sup>40</sup>
	120	2571		
Bone sample A . . . . .	0	2588	} 2027 : 25 = 81.0	13 <sup>44</sup>
	25	4615		
	45	6241	3653 : 45 = 81.1	
Blood sample . . . . .	0	6300	} 1713 : 100 = 17.13	14 <sup>30</sup>
	100	8013		
	200	9741	3441 : 200 = 17.2	
Uranium standard . . . . .	0	9780	} 657 : 10 = 65.7	17 <sup>61</sup>
	10	0437		
Natural effect (over night)	0	0450	} 3260 : 910 = 3.58 ± 0.06	} 18 <sup>02</sup> 9 <sup>12</sup>
	910	3710		
Uranium standard . . . . .	0	3744	} 1337 : 20 = 66.8	
	20	5081		

*Results.*

*Bone sample A*

Mean value . . . . .	3580 : 44		
	3653 : 45		
	7233 : 89 = 81.2		81.2 ± 0.95
			+ 4.4
Standard deviation . . . ±	$\sqrt{\frac{7233}{89}}$	= ± 0.95	85.6
	(81.2) <sup>2</sup>		- 3.6 ± 0.06
Resolution correction . . . .	$\frac{1500}{1500}$	= 4.4	82.0 ± 1

*Blood sample*

Mean value . . . . .	2077 : 122		
	3441 : 200		
	5518 : 322 = 17.2		17.2 ± 0.23
			+ 0.2
Standard deviation . . . ±	$\sqrt{\frac{5518}{322}}$	= ± 0.23	17.4
	(17.3) <sup>2</sup>		- 3.6 ± 0.06
Resolution correction . . . .	$\frac{1500}{1500}$	= 0.2	13.8 ± 0.25



neutron source of 100 milliCurie for a few minutes. The activity decaying with a period of  $2\frac{1}{2}$  hours is extremely strong so that the decay can be followed without difficulties from a few hundred impulses per minute in the beginning through 5—6 periods of decay. The decay curve drawn in a logarithmic scale (i. e. logarithm of the number of impulses per minute plotted against time) is a straight line. The very highest points of this curve may be found too low, indicating that the amplifier system did not resolve all impulses when counting at high speed. The difference between the effective number of counts and that number found from extrapolating the straight line up to its beginning being a measure of the "loss" in the registering system. As a satisfactory approximation for the calculation of this difference one may apply an empirical formula of the type

$$N = N_0 + \frac{N_0^2}{k}$$

where  $N$  is the actual number of counter discharges, and  $N_0$  is the number of impulses which are registered. The constant  $k$  is determined empirically from the measured decay curve. For the amplifier systems described on the preceding pages the constant  $k$  was found in this way to be 1,500, which means that 100 counts per minute involve a resolution error of  $\pm 6$ .

The author wishes to express her deepest gratitude to Professor NIELS BOHR for the hospitality granted at the Institute of Theoretical Physics, Copenhagen, and for the great interest he has taken in this work. My heartiest thanks are due Professor G. HEVESY for suggesting and continuously stimulating the development of the method. Dr. O. R. FRISCH has frequently supported this work with valuable advice.

### Summary.

The present paper gives a detailed description of the construction and the assembly of a Geiger counting tube, of a simple amplifier circuit, and a suitable shielding arrangement. Furthermore, the measuring procedure as well as a number of corrections necessary for the calculation of the final results are discussed.

## References.

- BJERGE, T., "Studier over kunstig Radioaktivitet . . . ." Doktor Disputats, København 1938.
- GEIGER, H., Handb. Physik 2nd Ed. XXII: 2. 155.
- HEVESY, G., Ann. Rev. Biochem. 1940. 9. 694.
- HEVESY, G., and L. HAHN, Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd. 1940. 15. 7.
- MAKOWER, W., and H. GEIGER, Practical measurements in radioactivity, London 1912.
- NEHER, H. V., and W. W. HARPER, Phys. Rev. 1936. 49. 940.
- RUARK, A., Phys. Rev. 1938. 53. 316.
- THIBAUD, J., L. CARTAN et P. COMPARAT, Quelques Techniques Actuelles en Physique Nucléaire. Paris 1938.
- TROST, A., Z. Physik 1937. 105. 399.
-

## The Oxygen Consumption of the Isolated Perfused Cat's Brain.<sup>1</sup>

By

TORE BROMAN and DORA JACOBSON.

---

Up to now the O<sub>2</sub>-consumption of the brain in vivo has been determined by two methods. By far most investigators compared the composition of the arterial and the venous blood — measuring or neglecting the rate of blood flow. This method may be useful in determining changes in the O<sub>2</sub>-consumption of the brain but is inadequate for establishing absolute figures.

SCHMIDT (1928) and HEYMANS and BOUCKAERT (1935) have described methods for perfusing the dog's brain, but they did not measure the O<sub>2</sub>-consumption. CHUTE and SMYTH (1939) have devised a method of perfusing the isolated cat's brain and an apparatus for recording continuously the O<sub>2</sub>-consumption. In this preparation the extracerebral structures are removed as far as possible or eliminated from the circulation by ligating all branches of the common and external carotid arteries except the internal maxillary artery. The vertebral and spinal vessels are compressed by means of an ecraseur. Cannulas are tied in the carotid arteries and the jugular veins and connected with the perfusion apparatus. In a closed circuit system the O<sub>2</sub>-consumption as well as the rate of blood flow are measured. The most obvious criteria of a survival of function in the preparation are the following: 1) The corneal reflex can be elicited. 2) The pupillary light reflex has been observed. 3) In response to noise the wink reflex has been obtained.

---

<sup>1</sup> Received 20 May 1941.

In the experiments of CHUTE and SMYTH the  $O_2$ -consumption of their preparation amounted to 200—300 c. c. per hour and 100 gram of tissue weight. The authors consider these figures as possibly some 14 per cent too high since in experiments on the glucose usage the extracranial tissues accounted for that part of the total glucose usage.

We have repeated the experiments of CHUTE and SMYTH and can confirm their results except as to the part which the extracerebral tissues take in the total metabolism of the preparation, which we found to be considerably greater. This implies lower figures for the  $O_2$ -consumption of the brain. In our experiments the  $O_2$ -consumption of the extracerebral tissues was measured directly after excluding the brain from the circulation. This was achieved by the following procedure: a rubber balloon was introduced through a hole in the skull and inflated to a pressure, exceeding that of the blood. The effectiveness of the procedure was controlled by adding methylene blue to the blood and demonstrating that the brain remained uncoloured.

The table gives the figures of 4 experiments. The  $O_2$ -consumption of the whole cat was measured under Evipal-narcosis. All figures represent the  $O_2$ -consumption per hour and 100 gram of tissue weight.

Whole cat	Perfused head	Extra-cerebral tissues	Brain
— . . . . .	38	20	104
36 . . . . .	34	12	118
35 . . . . .	42	21	128
32 . . . . .	43	18	131

In our experiments the  $O_2$ -consumption of the brain is considerably lower than the figures given by CHUTE and SMYTH. Anaesthesia is not a contributing factor in our lower figures since no Evipal was injected during the last 30—40 minutes before the beginning of perfusion and Evipal is known to be thoroughly eliminated within this time.

The cat's brain represents 0.7—1.1 per cent of the total body weight, whilst the brain consumes 2.5—5 per cent of the whole body's  $O_2$ -intake.

One of the authors (T. B.) wishes to express his gratitude to Dr. A. L. CHUTE and Dr. D. H. SMYTH, who made him familiar with their method during his two months' visit to Professor C. LOVATT EVANS' laboratory in London. The expenses of this work have been met by a grant from the Kungl. Fysiografiska Sällskapet.

#### References.

- CHUTE, A. L. and D. H. SMYTH, *Quart. J. Physiol.* 1939. 29. 379.  
HEYMANS, C. and J. J. BOUCKAERT, *J. Physiol.* 1935. 84. 367.  
SCHMIDT, C. F., *Amer. J. Physiol.* 1928. 84. 202. 223.
-

## Über zentrale Kurarewirkungen.<sup>1</sup>

Von

U. S. v. EULER und H. WAHLUND.

---

Reizwirkungen von Kurare bei direkter Applikation in das zentrale Nervensystem sind mehrfach beschrieben worden. MARTIN-MAGRON und BUISSON (1859), BEZOLD (1860), TILLIE (1890) und SANTESSON (1920) haben an Fröschen hierbei strychninartige Effekte beobachtet. Auch an Hunden wurden gleichartige Wirkungen nach intraspinaler und intraventrikulärer Injektion gefunden (Mc GIVIGAN 1916).

Strychninartige Wirkungen sollen nach BLUME (1934) an Meerschweinchen, Ratten und Mäusen auch nach subkutanen Kurarinjektionen eintreten.

Auf den Blutdruck scheint Kurare bei extrazentraler Darreichung mässiger Dosen nur im geringeren Umfange einzuwirken. Die von LATSCHENBERGER und DEAHNA (1876), GRÜTZNER und HEIDENHAIN (1878) und TILLIE (1890) beobachtete Blutdrucksteigerung an Kaninchen nach intravenös zugeführtem Kurare wurde auf eine zentrale Reizbarkeitssteigerung zurückgeführt. Dieser Effekt wurde an Katzen und Hunden vermisst. In letzterer Zeit haben CANNON und ROSENBLUETH (1934), sowie PINKSTON, PARTINGTON und ROSENBLUETH (1936) über eine Blutdrucksteigerung bei intravenöser Zufuhr von Kurare an der sympathektomierten Katze berichtet. BROWN und MAYCOCK (1939) konnten dieses Ergebnis bei Verwendung von gereinigtem Kurarin nicht bestätigen, sondern fanden ausschliesslich eine kurzdauernde Senkung. Ob diese Wirkungen zentral oder peripher bedingt sind, scheint nicht aufgeklärt zu sein.

---

<sup>1</sup> Eingegangen am 29. Mai 1941.

Die Wirkungen des Kurare auf die Atmung sind nur in geringem Umfange studiert worden. BLUME fand in seinen oben erwähnten Versuchen eine erhöhte Atmungsfrequenz, und in Versuchen von KAHLSON und PEIL (1937) trat anfangs eine gewisse Atmungssteigerung nach intravenösen Kurareinjektionen zu Tage.

Da die Wirkungen von Kurare in bezug auf Blutdruck und Atmung recht wenig bekannt sind, haben wir einige Versuche hierüber vorgenommen mit besonderer Berücksichtigung der zentralen Wirkungen. Einige Versuche über die Beeinflussung der spinalen Reflexerregbarkeit wurden ebenfalls angestellt.

### Methodisches.

Als Versuchstiere wurden Katzen benutzt, die mit Chloralose (0.07 g/Kg) narkotisiert waren. Der Blutdruck wurde aus der A. carotis communis und die Atmung mittels einer Mareykapsel, die an die Trachealkanüle angeschlossen war, registriert. In allen Versuchen wurden beide Carotissinusgebiete denerviert.

Die Kurarelösungen wurden in die Zisterna cerebello-medullaris injiziert. In den Reflexversuchen geschah die Injektion intralumbal.

Als Kurarepräparat wurde ein Topfkurare von guter Qualität benutzt. In einigen Versuchen haben wir reines Kurarinchlorid als Kontrolle benutzt, das ganz übereinstimmende Ergebnisse lieferte<sup>1</sup>.

Bei den Reflexversuchen wurde als Indikator die ipsilaterale Hemmung des gekreuzten Streckreflexes am Quadriceps benutzt.

#### a. Wirkungen auf Blutdruck und Atmung nach zentraler Kuraredarreicherung.

Nach intrazisternalen Dosen von 0.1—0.5 ml 2 % Kurarelösung oder 0.2 % Kurarinlösung trat binnen einiger Minuten eine Blutdrucksteigerung ein, die ziemlich langanhaltend war (Fig. 1). Nach den grösseren Dosen trat in einigen Fällen eine auffallende Unregelmässigkeit des Blutdruckes auf mit rhyth-

<sup>1</sup> Das Kurarepräparat wurde uns von Herrn Prof. Dr. G. LILJESTRAND gütigst zur Verfügung gestellt, und das Kurarin verdanken wir Dr. C. KING, London.

misch verlaufenden Blutdruckschwankungen, die besonders nach Durchtrennung der Vago-depressoren ausgesprochen waren.

Die Atmung wurde in allen untersuchten Fällen gesteigert gefunden und war bei voll entwickelter Kurarewirkung sowohl stark beschleunigt wie in der Amplitude vergrössert, weshalb die Ventilation sehr beträchtlich zunahm (Fig. 1). Die in einigen

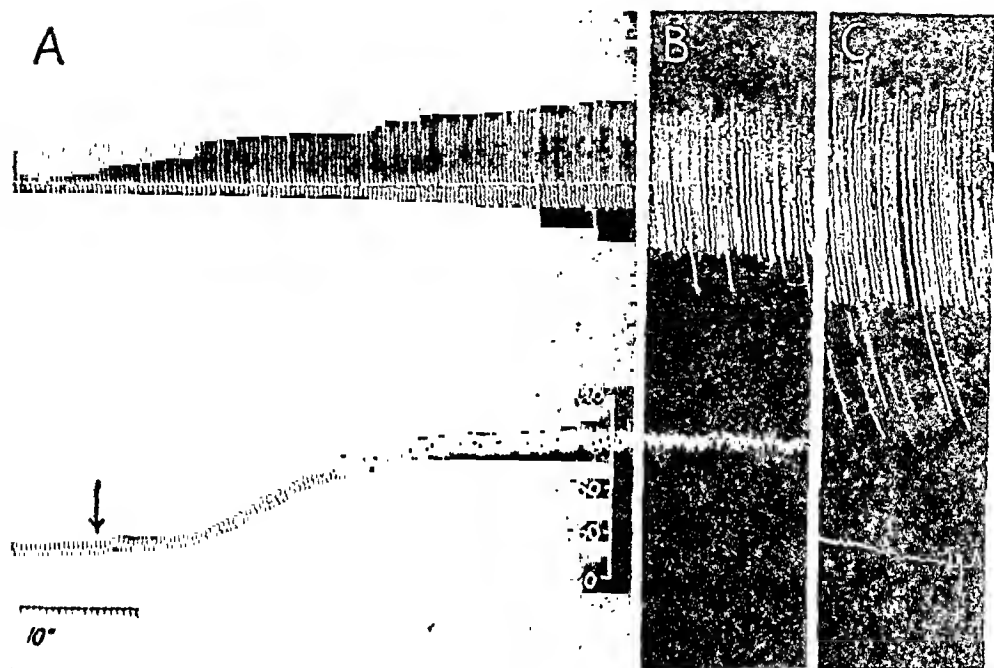


Fig. 1. Katze, Chloralose. Sinusgebiet und Vago-Depressoren ausgeschaltet. Oben Atmung, unten Blutdruck. A. 0.1 ml. 2 % Kurarelösung intrazisternal. B. 35 Min. später. C. 10 Min. nach B.

Fällen zu beobachtende Blutdrucksenkung ist wahrscheinlich zum Teil auf die Hyperventilation und zum Teil auf zentrale Lähmung des Vasokonstriktorzentrums zu beziehen. Nach den mittleren und grösseren Dosen wurde die Atmung oft krampfartig verändert im selben Masse wie lokalisierte und allgemeine Krämpfe — etwa wie nach Kaliumchloridzufuhr intrazisternal (EULER, 1938) — auftraten. Diesem Zustand folgte nach Zufuhr der grösseren Dosen ein zentral bedingter Atmungsstillstand bei noch vorhandenen allgemeinen Krämpfen und erhöhtem Blutdruck.

Injektionen von Kurare in zentraler Richtung durch die A.



carotis interna bewirkte einen kurzdauernden Blutdruckabfall mit Bradycardie, die als Zeichen einer zentralen Vagusreizung gedeutet wurde.

#### b. Wirkung von Kurare auf die spinale Reflexerregbarkeit.

Bekanntlich lässt sich die durch ipsilaterale Ischiadicusreizung hervorgerufene Hemmung des gekreuzten Streckreflexes an der

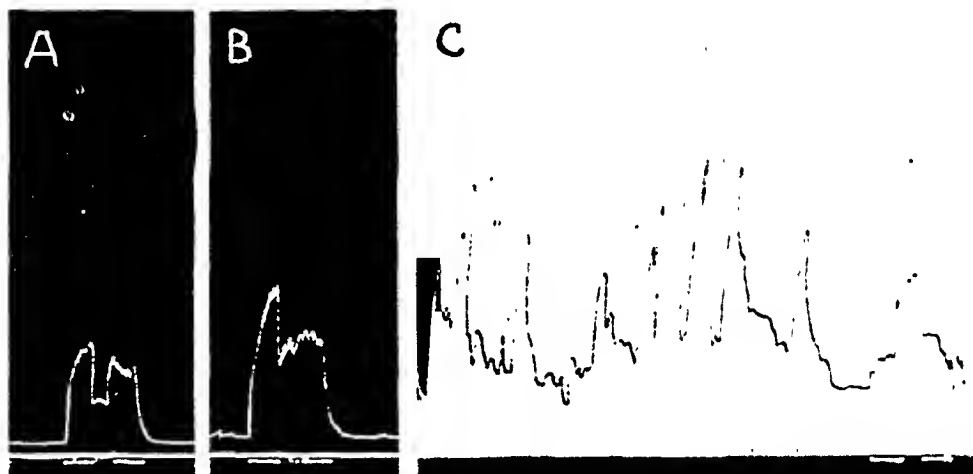


Fig. 2. Katze, dezerebriert. Spannungskurve des M. Quadriceps. Ipsilaterale Ischiadicusreizung zwischen 5 und 8 Sekunden nach Beginn der kontralateralen Ischiadicusreizung von 13 Sekunden Dauer. A. Vor dem Kurarin, B. 4 Minuten nach 0.1 ml 0.2 % Kurarinchlorid, C. 7 Minuten nach weiteren 0.2 ml Kurarinlösung.

Oberschenkelmuskulatur durch Strychnin in Erregung umtauschen. In einigen Versuchen an dezerebrierten Katzen haben wir die Wirkung von Kurare in dieser Hinsicht untersucht. Nach intralumbaler Darreichung von 0.2—0.3 ml 0.2 % Kurarinchloridlösung traten binnen einiger Minuten erhöhte Reflexerregbarkeit und Krämpfe auf. Die vorher konstant auslösbare Hemmung des kontralateralen Streckreflexes durch faradische Reizung des ipsilateralen Ischiadicus wurde nach kurzer Zeit in eine erregende Wirkung verändert (Fig. 2). Die Wirkung ist somit in dieser Hinsicht strychninartig.

### Besprechung der Ergebnisse.

Die Wirkung des Kurare auf Blutdruck und Atmung nach intrazisternaler Darreichung dürfte zweifelsohne auf eine Erregung des Vasomotoren- und Atmungszentrums zurückzuführen sein. An peripheren nervösen Strukturen wirkt Kurare wie es scheint nur erregungsvermindernd (Muskelendplatten, sympathische Ganglien, chemosensible Übertragung im Glomus caroticum).

Eine erregende Wirkung von Kurare an peripheren Synapsen oder Übertragungsstätten ist nicht mit Sicherheit bekannt. Versuche eine erregende Wirkung bei der Übertragung von motorischen Impulsen an quergestreifter Muskulatur nachzuweisen, fielen negativ aus.

Die Frage, ob zentrale Kurarewirkungen durch intravenöse Injektionen hervorzurufen sind, scheint derart beantwortet werden zu können, dass dies unter Umständen möglich ist. Die von CANNON und ROSENBLUETH (1934) beobachtete Blutdrucksteigerung bei intravenöser Kurareinjektion dürfte somit zentral ausgelöst sein wie auch die Atmungssteigerung in den Versuchen von BLUME. Wahrscheinlich ist der von THORNTON beschriebene Diaphragmaspasmus an Meerschweinchen nach intravenösen Kurarinjektionen ebenfalls zentraler Natur.

Die zentral erregenden Wirkungen von Kurare oder Kurarin zeigen mit denjenigen von Strychnin eine weitgehende Übereinstimmung (zentrale Blutdrucks- und Atmungssteigerung, Erregung des Vaguskernelnes, Aufwecken motorischer Krämpfe, Umtausch von normal hemmenden Impulsen in erregende).

Was die zentral funktionsherabsetzenden Wirkungen betrifft, treten dieselben wie beim Strychnin erst nach grösseren Dosen auf. Die hierfür nötigen Mengen dürften bei intravenöser oder intramuskulärer Zufuhr sehr gross sein, denn erst hohe Dosen intrazisternal führen solche Wirkungen herbei. Es ist deshalb u. E. weniger wahrscheinlich, dass die von ROSENBLUETH und CANNON beobachteten Blutdruckerhöhung durch zentrale Lähmung von Vasodilatoren stattfindet, sie dürfte eher durch Erregung von Vasokonstriktoren verursacht sein. Allerdings ist der Weg solcher vasokonstriktorischen Impulse am sympathektomierten Tier nicht bekannt. Aus den Versuchen von BACQ, BROUHA und HEYMANS (1934) sowie denen von BROWN und

MAYCOCK (1939) scheint jedoch hervorzugehen, dass vasokonstriktorische Impulse bei der Katze auf einen bisher unbekanntem Weg vom Zentrum nach der Peripherie verlaufen können. Die von ROSENBLUETH und CANNON beschriebenen Effekte könnten dann durch einen zentralen Erregungsvorgang eine Erklärung finden. Die von KAHLSON und PEIL gefundene Herabsetzung der Atemfrequenz des Kaninchens durch Kurare bei intravenöser Injektion wurde in unseren Versuchen an Katzen nicht beobachtet und braucht nicht unbedingt einen zentralen Hemmungsvorgang andeuten.

### Zusammenfassung.

Topfkurare und gereinigtes Kurarinchlorid erhöhen bei der Katze den Blutdruck und verstärken die Atmung nach intrazisternaler Injektion.

Bei längerer Einwirkung führen grössere Dosen Lähmung der Atmungs- und Gefässzentren herbei.

Intrazisternal oder intralumbal eingeführtes Kurare verursacht einen langdauernden Zustand lokaler und allgemeiner Krämpfe.

Durch die A. carotis interna zentral zugeführtes Kurare führt zentrale Vagusreizung herbei.

Die ipsilaterale Hemmung des gekreuzten Streckreflexes am Hinterbein der dezerebrierten Katze wird durch intralumbal zugeführtes Kurare in Erregung überführt.

Auf die Übereinstimmung der zentralen Kurare- und Strychninwirkungen wird hingewiesen.

### Literatur.

- BACQ, Z. M., L. BROUHA und C. HEYMANS, Arch. int. Pharmacodyn., 1934, 48, 429.  
 BEZOLD, v., Arch. Anat. Physiol., Lpz. 1860.  
 BLUME, W., Arch. exp. Path. Pharmak. 1934: 175, 745.  
 BROWN, G. L. u. W. MAYCOCK, J. Physiol., 1939/40, 97, 273.  
 CANNON, W. B. u. A. ROSENBLUETH, Amer. J. Physiol., 1934, 108, 599.  
 GRÜTZNER, P. u. R. HEIDENHAIN, Pflüg. Arch. Ges. Physiol. 1878, 16, 59.

- KAHLSON, G. u. M. PEIL, Skand. Arch. Physiol., 1937, 77, 282.  
LATSCHENBERGER, JOH. u. A. DEAHNA, Plüg. Arch. Ges. Physiol 1876,  
12, 159.  
MARTIN-MAGRON, u. BUISSON, J. Physiol. de l'homme et des animaux,  
1859, 2.  
MC GUIGAN, H., J. Pharmacol., 1916, 8, 471.  
PINKSTON, J. O., P. F. PARTINGTON u. A. ROSENBLUETH, Amer. J.  
Physiol., 1936, 115, 711.  
SANTESSON, C. G., Skand. Arch. Physiol., 1920, 40, 266.  
THORNTON, I. W., J. Physiol., 1938, 93, 40 P.  
TILLIE, J., Arch. exp. Path. Pharmak. 1890, 27, 1.
-

From The Neurophysiological Laboratory, The Caroline Institute,  
Stockholm.

## A Relation between Rod and Cone Substances, Based on Scotopic and Photopic Spectra of *Cyprinus*, *Tinca*, *Anguilla* and *Testudo*.<sup>1</sup>

By

RAGNAR GRANIT.

---

Two as widely different animals as man and the frog have the same visual purple with maximal absorption around  $0.500 \mu$  and also much the same daylight or photopic "visibility" curves with maxima around  $0.560 \mu$ . For man the sensation of brightness has been the index needed in measuring these curves. For frogs, however, the number of impulses, a threshold discharge or the size of the electroretinogram has been the index used. In the former case we generally speak of a "luminosity" curve, but probably the frog perceives brightness much as man does. Nevertheless the neutral, but very awkward term "visibility" curve is commonly used for animals, and quite often also as a substitute for "luminosity" when human sensations are concerned. As is well known PARSONS has introduced the adjectives "photopic" and "scotopic" for respectively daylight- and dim light- vision, and taking up them I shall use the brief terms "photopic" and "scotopic spectra" for daylight and dim light "visibility curves".

We now know that the photopic spectrum of the frog's eye represents a composite curve (GRANIT and SVAETICHIN, 1939) consisting of narrow elementary sensitivity bands, but also, as I have been able to confirm later, of broad bands very much like the average photopic curve, but lacking its expansion into the blue end of the spectrum. Further out than in  $0.600 \mu$  I

<sup>1</sup> Received 27 May 1941.

have never seen a maximum (GRANIT, 1941 b) and maxima in  $0.600 \mu$  are not very common. However, for the argument to be developed in this work it suffices, to begin with, to know that the maximum of the average photopic curve is located around  $0.560 \mu$ .

KÖTTGEN and ABELSDORFF (1896) made the first spectrophotometric analysis of another type of visual purple, the "visual violet" in certain freshwater fishes, which possesses a maximum around  $0.530-0.540 \mu$ . Assuming the scotopic curve of such fishes to follow the absorption curve of their visual violet, what would then be their spectral distribution of sensitivity after light-adaptation? Would the "Purkinje shift" in these eyes be of the order of magnitude and in the direction of the corresponding change in man and frogs and thus the photopic spectra of such fishes have maxima around  $0.600 \mu$ ? Using the reaction of the sunfish (*Lepomis*) to a moving coloured (filters) pattern as index GRUNDFEST (1932 a, b) came to the conclusion that this actually is the case and quite rightly regarded his result as evidence in favour of the view that cone substances are chemically related to rod substances. Otherwise, why did not the cones of the sunfish possess the photopic spectrum of man? The precise form of the frog's photopic spectrum was not at that time known. Now GRUNDFEST's photopic and scotopic curves were somewhat distorted by what he held to be absorbing filters inside the eye. And the work was restricted to that one species of fish. In particular some control experiments with fish possessing the visual purple of type  $0.500 \mu$  were required. Later we have found that the frog's photopic spectrum contains rather widely distributed sensitivity bands, and also that the eye of the white rat contains a narrow photopic band at  $0.600 \mu$  (GRANIT, 1941 c). This further complicates the issue.

This and other considerations, to be dealt with in the discussion, prompted me to investigate fishes at a relatively early stage in a program of research devoted to an analysis of colour reception with micro- and macroelectrodes. In this paper I have analysed the photopic and scotopic spectra of carp (*Cyprinus*) and tench (*Tinca*) as representatives of the  $0.540 \mu$  visual violet and of eel (*Anguilla*) as representative of the type  $0.500 \mu$  visual purple. As the work with the relatively pure cone eye of the greek tortoise (*Testudo*) unexpectedly shed new light upon the whole question, a detailed report of these

results has been included. The spectrum of the "red" isolated receptor of *Testudo* has already been described (GRANIT, 1941 a, b).

### Method.

The fishes were kept in a aerated basin into which a cage of reflecting network, illuminated from above by a 500 W lamp, could be sunk for light-adaptation. Their eyes were excised, opened and a microelectrode inserted under a binocular microscope in the manner described in several earlier papers, one of which (GRANIT and SVAETICHIN, 1939) was especially devoted to the technique of microrecording and controlling the energy of the spectrum.

The discharge, consisting of more or less isolated "spikes" of activity, was led off to an amplifier connected with a cathode ray and a loudspeaker. The impulses were simultaneously listened to and observed on the screen in the usual manner. In some experiments macroelectrode and string galvanometer were used for the recording of average curves. All results are given in terms of inverse value of energy needed for a threshold effect, be it absolute threshold, just perceptible acceleration of a spontaneous discharge or cessation of "flicker". They have always been recalculated in per cent of the maximum, and sometimes also corrected for presentation in terms of an equal quantum intensity spectrum (see legends under the figures).

### Results.

#### 1. Some General Observations.

Fish retinae are not very satisfactory material as the locus under the electrode often quickly dies or looses in sensitivity. Isolated elements are easily obtained but also particularly unstable. An "on"-effect often suddenly changes into an "off"-effect or *vice versa* when to all appearance the discharge still looks as if it came from the same element. However, from all types of fish a limited number of complete curves were obtained. To ensure correct placing of the maximum a great number of observations were taken around this region with the result that, in such cases, the rest of the curve often had to be left undetermined and a new reactive spot to be found. With the carp the average curve was checked up with the string galvanometer. No microelectrode experiments were made with this animal.

## 2. Photopic and Scotopic Spectra of *Cyprinus*.

Use of the string galvanometer with this fish, of which only a limited number was available, necessitated relatively strong light in order to obtain a sufficiently large deflection as index of sensitivity. This means that both photopic and scotopic elements are stimulated simultaneously, at least in the dark-adapted state. According to WUNDER (1925) this eye has roughly 38

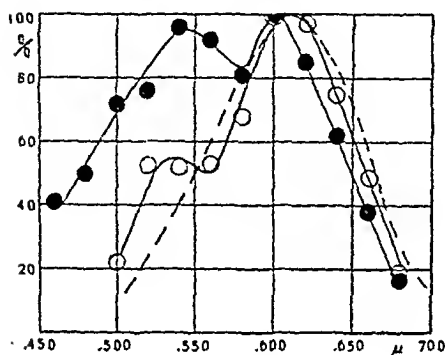


Fig. 1. Average distribution of sensitivity to supra-threshold spectral light of ● 3 scotopic and ○ 2 photopic carp. Broken line traces curve for isolated "red" element of the tortoise (GRANT, 1941, a, b). String galvanometer. Spectrum of equal quantum intensity.

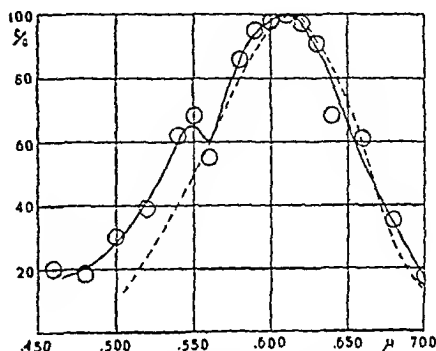


Fig. 2. Average of 230 readings from eyes of 14 tortoises (*Testudo graeca*), recorded with microelectrodes. Broken line as in fig. 1. Spectrum of equal quantum intensity.

rods per 12 cones, or a relatively high number of cones. The *a*-wave proved a better index than the *b*-wave.

Fig. 1 shows the photopic and scotopic spectra of three dark-adapted and two light-adapted carps. The scotopic curve clearly is composite and has two maxima, in 0.540 and in 0.600  $\mu$ . After light-adaptation the "green" half of the curve is greatly diminished and the remaining curve has expanded towards the long wave-lengths. Light-adaptation is probably not complete. The curve in broken lines illustrates the distribution of sensitivity of the isolated "red" receptor of *Testudo* (GRANT, 1941 a, b).

## 3. The Photopic Spectrum of *Testudo*.

In this practically pure cone-eye there is no difference between the photopic and scotopic curves. The eye only increases in sensitivity during dark-adaptation. The interesting point here



is the likeness between the photopic spectra of fish and the cone spectrum of the tortoise.

From this point of view it seemed of particular interest to average all the available data on the tortoise's eye independently of the type of curve to which they may have belonged. The curve of fig. 2 shows the result. The 230 average readings

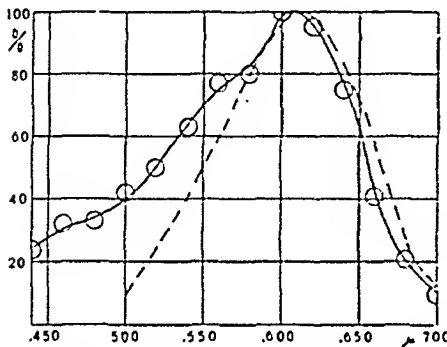


Fig. 3. Averages of 90 readings from 4 eyes of the tortoise. Broken line as in fig. 1. String galvanometer. Spectrum of equal quantum intensity.

were all obtained with micro-electrodes. The curve for the isolated "red" element is also shown in the same figure. The average curve is almost identical with that of photopic carps, but its form is, of course, also determined by the relative number of readings in the different regions of the spectrum.

Now the number of observations in the short wave-lengths

were few owing to the ease with which red-sensitive elements are obtained and the difficulty of finding other ones, so that it was deemed necessary to add a few observations on the composite response recorded with the string galvanometer. The eye of *Testudo* gives chiefly negative electroretinograms with relatively small positive phases (BERNHARD, 1941). Therefore the  $\alpha$ -wave was used as index of sensitivity. The curve obtained is shown in fig. 3. The presence of blue-sensitive elements is indicated by the hump in the short wave-lengths. But I have never succeeded in isolating a blue element in this eye, be it then that they do not come isolated or are few in number or of low sensitivity relative to the energy available in my spectrum. Some caution in interpreting this result is also suggested with all red-sensitive eyes owing to the fact that the diffusely spreading light of the spectrum is reddish in character.

Only once I have found a "green" maximum coupled with relatively low red-sensitivity. This curve is shown in fig. 4. Its maximum could well be caused by a low concentration of visual violet.

The photopic spectrum of the frog's eye is composite and for this reason it is of some interest to show a number of typical curves from the eye of the tortoise. Fig. 5 illustrates that there

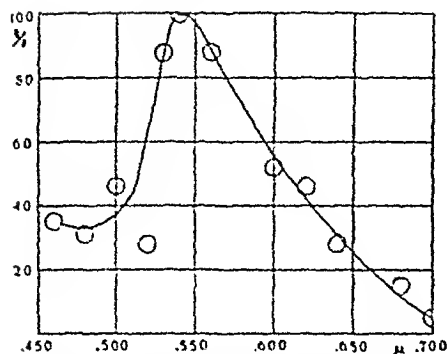


Fig. 4. Micro-electrode record of distribution of sensitivity of discharge with maximum in  $0.540 \mu$  in the retina of a tortoise. Spectrum of equal quantum intensity.

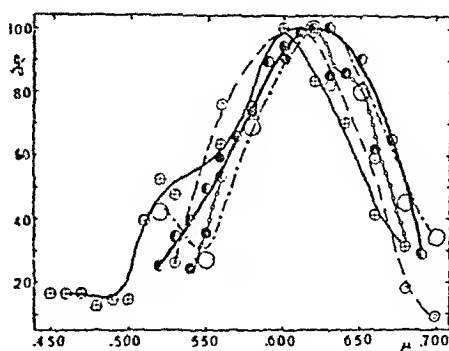


Fig. 5. Showing individual curves for the distribution of sensitivity to spectral light in tortoises. Recording with micro-electrodes. Equal energy spectrum.

is considerable variability also in this eye among the dominantly red-sensitive elements.

#### 4. The Scotopic and Photopic Spectra of *Tinca*.

Microelectrodes were used in all work with the tench. The relation of rods to cones in this fish is about 33:15 (WUNDER, 1925). The average curve for dark-adapted fish is given in fig. 6 where it is being compared with the absorption curve of the visual violet of the same animal. The latter curve is from a paper by BAYLISS, LYTHGOE and TANSLEY (1936) devoted to spectrophotometric analysis of visual purple in fishes. There is close agreement, except in the blue, where again is found a secondary rise. If dark-adaptation is insufficient or the light too strong, there is also found a hump around  $0.600 \mu$  just as in similar circumstances the frog's eye tends to give a hump around  $0.560 \mu$  (GRANIT, 1937). As some light is needed to insert the micro-electrode, it is necessary to wait some time before one begins to read off the values in the different regions of the spectrum.

In fig. 7 is illustrated the average photopic curve of *Tinca*. It tends to be somewhat broader towards the red end than the curve for the isolated "red" element of *Testudo*, shown in the same figure. There is still more variability among the "red" elements of this fish than in the tortoise. The reason for this may be that more observations from the red end were available. But I am rather inclined to believe that the greater varia-

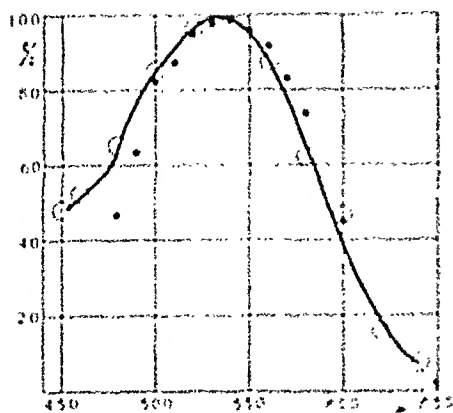


Fig. 6. Averages of 148 readings from the retina of 6 dark-adapted tenches. Micro-electrodes. Some isolated "spikes", some diffuse discharges. Black dots spectrophotometric values for visual violet, determined by BAYLIS, LYTHGOE and TANSLEY (1936). Spectrum of equal quantum intensity.

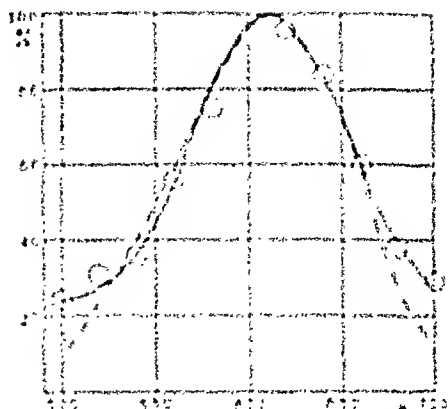


Fig. 7. Averages of 205 readings from the retina of 15 light-adapted tenches. Micro-electrodes. Some isolated "spikes", some diffuse discharges. Broken line traces isolated "red" element of *Tench's* as in fig. 1. Spectrum of equal quantum intensity.

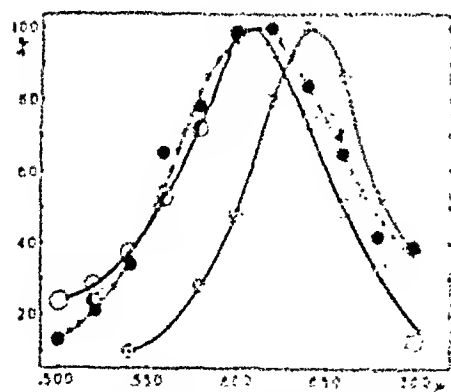


Fig. 8. Showing individual curves for the distribution of sensitivity of light-adapted tenches. Micro-electrodes. Equal energy spectrum.

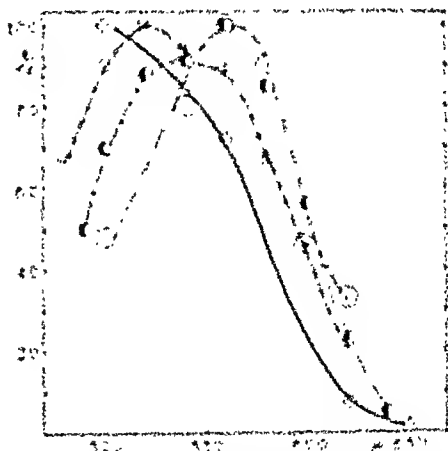


Fig. 9. Showing individual curves for the distribution of sensitivity of light-adapted eel. Micro-electrodes. Equal energy spectrum.

tion is physiological. Occasionally one could find a maximum as far out as in  $0.640 \mu$  with the tortoise, but such curves were more often seen with the tench. Also there were some very narrow curves in the eye of *Tinca* just as in the frog's eye. Samples of individual photopic curves are shown in fig. 8.

### 5. The Photopic Spectrum of *Anguilla*.

The so-called freshwater eel has a visual purple of the type found in frogs and mammals (BAYLISS, LYTHGOE and TANSLEY, 1936). Its retina is dominated by rods but is also supplied with cones (BAYLISS, LYTHGOE and TANSLEY, 1936). The eyes of eel survived better than those of the other fishes and it could easily be shown that during dark-adaptation the spectrum shifted to the region of  $0.500 \mu$ . But the attention in this work was devoted to looking for the extremely red-sensitive receptors which are found everywhere in the retinae of carp, tench and tortoise. To this end the microelectrode was shifted from spot to spot in a search for such red-sensitive elements. But the search proved fruitless. In the 5 fishes available only curves of the type previously seen with the frog's eye were found. Samples are given in fig. 9. The shortening of the spectrum towards the red end is very obvious by comparison with the curves shown in the previous figures.

As a matter of fact it proved very difficult to light-adapt eel. Most curves tended to give secondary maxima between  $0.500 \mu$  and  $0.560 \mu$  and it was impossible to find any maxima outside  $0.560 \mu$ . Strong light-adaptation of the opened excised eye tended to depress the sensitivity below the threshold of the energy available in the spectrum. The reason for this is probably the relative paucity of cones (rods: cones = 143:7, WUNDER, 1925). The sensitivity to red was remarkably low also in absolute terms and not only by comparison with the maxima found. An interesting fact was the tendency of the slightly dark-adapted eel's retina to discharge for several minutes when left illuminated by the light of the binocular microscope.

### Relation between the Visual Purples and the Cone Substances.

KÖTTGEN and ABELSDORFF (1896), GRUNDFEST (1932) and BAYLISS, LYTHGOE and TANSLEY (1936) all came to the conclusion that the maximum of the difference spectrum of visual violet was located between  $0.535$ — $0.540 \mu$ , but the last mentioned authors also describe a number of other forms of visual purple with maxima intermediate between the two previously known substances. WALD (1939) objects to the use of difference

spectra and seems to hold that there are only two substances, the visual purple (*rhodopsin*) and the visual violet, which he calls *porphyropsin*. The latter substance is found in freshwater fishes. According to his view intermediate maxima must be given by mixtures of rhodopsin and porphyropsin. This question cannot yet be regarded as experimentally decided though WALD's suggestion seems probable. But it is of no immediate interest here as the eyes of the tench (BAYLISS ET AL.) and the carp (SAITO, 1938, WALD, 1939) only contain visual violet. The maximum of this substance, if not measured as a difference spectrum, is between 0.520 and 0.530  $\mu$  (SAITO, 1938, WALD, 1939). The measurements presented above for the tench show the values for 0.520 and 0.540  $\mu$  to be respectively 96 and 100 %. The difference is small and absorbing filters may influence electro-physiological measurements and also spectrophotometric ones, until solutions of visual violet can be guaranteed to be chemically pure.

Too much emphasis should not be laid on the precise distance in the spectrum between, on the one hand, visual purple and the photopic spectrum, and, on the other hand, visual violet and the photopic spectra found in fishes possessing porphyropsin. The photopic spectra are dominated by components with maxima which may be some 0.050  $\mu$  apart, components which may represent narrow or broad sensitivity bands. Though in the eyes of fish having visual violet they average out to a maximum between 0.600 and 0.620  $\mu$ , individual narrow curves in the frog's eye also may reach a maximum as far out as in 0.600  $\mu$ . But then individual sensitivity bands in the eye of the tench may go still some 0.050  $\mu$  further out into the red. And this is not a peculiarity of fish cones as such since the photopic eye of the eel containing the ordinary visual purple is even less sensitive, on an average, to red than that of the frog.

The principal conclusion must therefore be that in eyes containing visual violet with absorption shifted further out towards the red end by comparison with the type 0.500  $\mu$  visual purple, the photopic spectra of the dominating cone substances are also shifted further out in the same direction. This result is difficult to understand, particularly in the light of the experiments with *Anguilla*, unless it be assumed that the cone substances are chemically related to the rod substances. This assumption is as old as the knowledge of visual purple but it is now based on facts which otherwise are difficult to explain except as sheer coincidences! It is quite possible that such substances are being formed in the

rods during illumination. Such changes I found it necessary to assume in order to explain results with the rat's eye (GRANIT, 1941 c) but these substances must also be preformed in the cones. The discovery in *Testudo* of a cone-system with similar properties as those found in photopic eyes containing visual violet shows that preformed cone-substances cannot be distinguished from those found after light-adaptation in fish.

Visual violet and visual purple behave similarly in solution but the spectra of bleached products are, for the latter substance, uniformly displaced 0.020—0.030  $\mu$  towards the red (WALD, 1939). Thus, for instance, the yellow carotinoid retinine<sub>1</sub> extracted by WALD after decomposition of visual purple has its counterpart in a deep yellow retinine<sub>2</sub> obtained from similarly treated solutions of visual violet. Of great interest is the fact that the vitamin A<sub>1</sub> in the eyes of frogs and fishes possessing visual purple is replaced with vitamin A<sub>2</sub> in eyes having visual violet (WALD, 1939).

We may regard visual purple as a chromoprotein (WALD, 1935—36; KRAUSE and SIDWELL, 1938) with a protein carrier in which every molecule "carries" about 10 chromophores (BRODA, GOODEVE and LYTHGOE, 1940). It can easily be imagined that a small shift in the structure of the linkage between chromophores and carrier suffices to change the absorption spectra and stabilize the structure into something less sensitive to light than the original form. WEIGERT (see summary by WEIGERT and MORTON, 1940) has made interesting models of visual purple dissolved in gelatine reproducing characteristics of colour reception. And the "green" substance of the rat's eye has been shown to have the absorption spectrum of a "narrow" visual purple curve (GRANIT, 1941 c).

v. STUDNITZ (1937, 1940) has studied "cone substances" from the eyes of frog, fish and tortoise and in all cases found maxima around 0.560  $\mu$ . Actually the cone substance of the tortoise, as we have seen, has its maximum shifted about 0.050  $\mu$  towards the red from that of the frog. This difference is not reproduced by v. STUDNITZ's methods and his results for the tortoise thus do not show anything like the order of agreement found between my results and the measurements of visual purple absorption spectra.<sup>1</sup> For this reason his work fails to convince.

---

<sup>1</sup> "In Bezug auf ihre Lichtabsorption verhalten sich die Ätherextrakte aus Fisch- und Froschnetzhäuten genau gleich den von den Schildkröten erhaltenen." (v. STUDNITZ, 1937).

Evidence for a common origin of rod and cone substances has also been supplied by JEANS and ZENTMIRE (1934) who in the belief that they measured dark-adaptation of the rods studied the early phase of dark-adaptation with a sensory method and found this phase to be sensitive to lack of vitamin A in the food. To those acquainted with the subject of vision it was clear that cone-adaptation was being studied. With improved technique HECHT and MANDELBAUM (1940) confirmed their results and drew the obvious conclusion which JEANS and ZENTMIRE had missed.

### Colour Reception.

A discussion of colour reception is better postponed to theoretical papers dealing with all the results assembled with different types of eyes. The results presented in this paper show that colour reception in fishes and tortoises is organized on the principles previously described for frogs (GRANIT and SVAETICHIN, 1939) and rats (GRANIT, 1941 c). It is also well known that fishes can be trained to react on the basis of a high degree of colour discrimination. (See *e. g.* a review by v. FRISCH, 1925, and later papers mentioned in a book by v. STUBNITZ, 1940).

In this connexion I only want to point out the limitations of the micro-electrode technique which chooses the common types of elements at the expense of rare ones. From this point of view it is interesting to compare the average curve from the eye of the tortoise, taken with string galvanometer and large electrodes (fig. 3), with the curves obtained with micro-electrodes (fig. 5). There is a hump in the green and one in the blue region, but with the micro-electrode I have only once had a definite "green" maximum and never a blue one, though some of the "red" curves have had a hump in the blue region. With my very much larger material of curves from the frog's eye I have about 3—4 % of definitely and predominantly "blue" elements. If with the very red-sensitive fishes and tortoises the expansion and secondary humps in the blue and violet region merely were due to irradiated reddish light in the spectrum it would be difficult to understand the high degree of selectivity with which sensitiveness to short wave-lengths occurs from experiment to experiment. Considering that fishes are red-sensitive it is remarkable how far out into the violet they are capable of reacting to light. This is also the experience of those who have studied

colour discrimination with training methods (see *e. g.* SCHIEMENZ, 1924; WOLFF, 1925).

The explanation of the fact that dominantly blue- or violet-sensitive elements have not been found with the micro-electrodes must be that these elements are relatively few or else that they are coupled to the other ones and thus not independent. The curves indicate that these elements would be sufficiently sensitive, at least in the eyes of the tench, to be above the threshold of the apparatus.

In the tortoise it is clear that the broad average curve recorded with string-galvanometer hides other elements than the "red" one which is so easy to isolate.

### Summary.

The distribution of sensitivity to spectral light of light-adapted ("photopic spectra") and dark-adapted ("scotopic spectra") fishes and the tortoise (*Testudo graeca*) have been determined for isolated or a restricted number of elements with micro-electrodes, leading off from the retina to amplifier, cathode-ray and loudspeaker. In some cases the average distribution of sensitivity has been directly recorded with string-galvanometer.

Fishes with "visual violet" absorbing maximally around  $0.530-0.540 \mu$  have scotopic spectra determined by the absorption curve of this substance; fish (eel) with "visual purple" absorbing maximally around  $0.500 \mu$  have a scotopic spectrum determined by the latter substance. The sensitivity to short wave-lengths, however, is greater than is to be expected from spectrophotometric measurements of visual purples.

After light-adaptation fishes with visual violet give an average photopic spectrum with maximum between  $0.600-0.620 \mu$  whereas the photopic curves of the eel (visual purple) do not have maxima further out than in  $0.560 \mu$ .

The fact that the photopic curves for different species are shifted towards the red end in proportion to the scotopic curves of the same species is regarded as evidence for chemical inter-relationship between rod and cone substances.

The practically pure cone-eye of the tortoise is found to have its system of colour reception organized on the same principles as that of photopic fish with eyes containing visual violet.

The average curves are composite curves, consisting of ele-



mentary curves, some of which are broad, others narrow, and having maxima which may be some  $0.050 \mu$  apart in the spectrum. This should form a basis for colour discrimination.

In addition it is necessary to postulate at least one separate substance sensitive to short wave-lengths.

Comparison of the average curve for the tortoise, as recorded with string-galvanometer, with that of the isolated "red" element shows that the latter alone cannot be responsible for the high values and the "hump" in the green and the blue regions of the spectrum.

The author is indebted to The Rockefeller Foundation for a grant to this Laboratory.

#### References.

- BAYLISS, L. E., R. J. LYTHGOE and K. TANSLEY, *Proc. Roy. Soc. B.* 1936, *120*, 95.
- BERNHARD, C. G. 1941. Unpublished observations.
- BRODA, E. E., C. F. GOODEVE and R. J. LYTHGOE, *J. Physiol.* 1940, *98*, 397.
- v. FRISCH, K., *Z. vergl. Physiol.* 1925, *2*, 393.
- GRANIT, R., *Nature, Lond.* 1937, *140*, 972.
- , *This Journal*, 1941 a, *1*, 370.
- , *This Journal*, 1941 b, *1*, 386.
- , *This Journal*, 1941 c, *2*, 93.
- , and G. SVAETICHIN, *Upsala Läkaref. Förhandl. N. F.* 1939, *45*, 161.
- GRUNDFEST, H., *J. gen. Physiol.* 1932 a, *15*, 307.
- , *J. gen. Physiol.* 1932 b, *15*, 507.
- HECHT, S. and J. MANDELBAUM, *Amer. J. Physiol.* 1940, *130*, 651.
- JEANS, P. C. and Z. ZENTMIR, *J. Amer. Med. Ass.*, 1934, *102*, 892.
- KRAUSE, A. C. and A. E. SIDWELL, *Amer. J. Physiol.* 1938, *121*, 215.
- KÖTTGEN, E. and G. ABELSDORFF, *Z. Psychol. Physiol. Sinnesorg.* 1896, *12*, 161.
- SAITO, Z., *Tohoku J. exp. Med.* 1938, *32*, 432.
- SCHIEMENZ, F., *Z. vergl. Physiol.* 1924, *1*, 175.
- v. STUDNITZ, G., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1937, *239*, 515.
- , *Physiologie des Sehens*, Leipzig 1940.
- WALD, G., *J. gen. Physiol.* 1935—36, *19*, 351.
- WALD, G., *J. gen. Physiol.* 1939, *22*, 775.
- WEIGERT, F. and J. W. MORTON, *Ophthalmologica (Basel)*. 1940, *99*, 145.
- WOLFF, H., *Z. vergl. Physiol.* 1925, *3*, 279.
- WUNDER, W., *Z. vergl. Physiol.* 1925, *3*, 1.

From the Institute of Theoretical Physics and  
the Carlsberg Laboratory, Copenhagen.

## Potassium Interchange in Yeast Cells.<sup>1</sup>

By

GEORGE HEVESY and NIELS NIELSEN.

---

Using radiophosphorus as an indicator, phosphate present in the yeast cells was found to interchange slowly with the phosphate of the nutrient solution (HEVESY, LINDERSTROM-LANG and NIELSEN, 1937). Recently, we extended this investigation to the behaviour of potassium, using radiopotassium (<sup>42</sup>K) as an indicator. In this note, experiments on the uptake and release of radiopotassium by the yeast cells are communicated.

### Experimental Procedure.

The yeast used in our experiments has been grown for three to five days in beerwort at 25°. A pure yeast culture was applied. The yeast was separated by centrifuging and was purified by repeatedly suspending it in water and centrifuging the suspension. The suspension finally obtained contained yeast corresponding to a dry substance weight of 1.5 gm per 100 cm<sup>3</sup>.

The nutrient solution (pH = 4.5) had the following composition: 1.4 gm MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 2.0 gm NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.0 gm KCl; 0.8 gm CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 1.2 gm (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01 gm FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 100 gm saccharose; 0.2 γ biotin; 100 γ aneurin; 2 mgm β-alanin; 2.0 gm citric acid per liter. The KCl was replaced by labelled KCl in those cases in which the intrusion of <sup>42</sup>K from the nutrient solution into the yeast cells was investigated.

At the start of the experiment, 1 volume yeast suspension was mixed with 1 volume nutrient solution. The dry substance of the yeast was determined in the usual way by filtering the suspension through a glass filter (1 G 4 Schott) and by drying the yeast at 105°. The potassium content of the yeast and the nutrient solution was

---

<sup>1</sup> Received 3 June 1941.

determined by the method of WINKEL and MAAS (1936) respectively KOLTHOFF and BENDIX (1939). The samples analyzed contained 10—20 mgm potassium. The yeast suspended in nutrient solution was shaken in a thermostat kept at 25°. The samples taken at intervals were sharply centrifuged; they were not washed before analysis in order to prevent loss of potassium by the yeast.

In some of our experiments, the KCl content of the nutrient solution was replaced by labelled potassium chloride; in other experiments, yeast containing labelled potassium was placed in a non-radioactive nutrient solution. The labelled potassium chloride was prepared by bombarding KCl with deuterons accelerated in the cyclotron. The radiopotassium used in our experiments had an activity amounting to less than 0.001 milliCurie. This activity was found not to influence the growth of the yeast.

### Radioactive Analysis.

By comparing the radioactivity of the yeast and the nutrient solution samples we obtain the ratio of their  $^{42}\text{K}$  content.<sup>1</sup> The comparison was carried out by using a Geiger counter. As the weight of the yeast samples was much smaller than the weight of the nutrient solution samples we mixed some ash of non-active nutrient solution to the yeast samples and obtained thus yeast samples having the same weight and almost the same composition as the active nutrient solution samples. The ash sample obtained by this procedure weighed about 120 mgm. It was put in a small aluminium dish of 1.1 cm diameter and placed under the window of the Geiger counter. The procedure described above has the advantage that the absorption of the radioactive ( $\beta$ ) radiation in the samples, the activity of which is to be compared, becomes equal and thus can be disregarded.

### Results.

In some experiments (I, II, and III), labelled yeast was suspended in non-labelled nutrient solution and by analyzing the samples taken at intervals the amount of  $^{42}\text{K}$  was determined which migrated from the yeast into the nutrient solution. The labelled yeast was obtained by growing yeast in a nutrient solution containing labelled potassium.

In other experiments (IV and V), non-labelled yeast was placed in nutrient solution containing labelled potassium. At different intervals, samples of yeast and nutrient solution were taken and their  $^{42}\text{K}$  and their total potassium contents were determined.

<sup>1</sup> The "natural" radioactivity of potassium could be neglected in our experiments.

Table 1.

Analytical data.

a) Yeast placed in nutrition solution containing  $^{42}\text{K}$ .

Time in hours	Fraction	K content of 100 cc in mgm	Distribution coefficient between yeast and nutrition solution		Percentage increase in the dry substance of the yeast
			Total potassium	$^{42}\text{K}$	
0	Nutrition solution	21.8	0.43	0	—
	Yeast . . . . .	9.1			
	Total . . . . .	30.4			
2	Nutrition solution	19.1	0.68	0.38	5.5
	Yeast . . . . .	12.0			
	Total . . . . .	31.1			

b) Yeast containing  $^{42}\text{K}$  placed in nutrition solution.

Time in hours	Fraction	K content of 100 cc in mgm	Distribution coefficient between nutrition solution and yeast		Percentage increase in the dry substance of the yeast
			Total potassium	$^{42}\text{K}$	
20	Nutrition solution	20.0	1.71	0.91	9.9
	Yeast . . . . .	11.7			
	Total . . . . .	31.7			
44	Nutrition solution	17.4	1.23	1.14	1.0
	Yeast . . . . .	14.1			
	Total . . . . .	31.0			

The analytical data obtained in the first experiment are recorded in Table 1. In this experiment, non-labelled yeast was first placed in a labelled nutrient solution and, after the lapse of 2 hours, a sample of the yeast and a sample of the nutrient solution were analysed. The next step was to place the centrifuged yeast which now contained  $^{42}\text{K}$  in a non-labelled nutrient solution. One sample was taken after the lapse of 20, another sample after the lapse of 44 hours. Chemical and radioactive analyses of the samples were then carried out.

Table 2.

*Distribution of  $^{42}\text{K}$  between yeast and nutrition solution.*

Number of experiment	Time in hours	Distribution coefficient of $^{42}\text{K}$ between yeast and nutrition solution respectively between nutrition solution and yeast <sup>1</sup>			Strength of fermentation	Percentage increase in the dry substance of the yeast
		Assumed absence of potassium exchange <sup>2</sup>	Assumed total potassium exchange	Found		
I	2	Started with active nutrition solution 0.16   0.63   0.38			slight	5.5
	20	Started with active yeast 0.03   1.71   0.91			very strong	3.9
	44	0   1.23   1.14			very strong	1.0
II	2	Started with active nutrition solution 0.26   0.90   1.05			very strong	11.3
	2	Started with active yeast 0.01   1.04   0.14			fairly strong	- 0.4
III	2	Started with active nutrition solution 0.16   0.61   0.14			fairly strong	5.7
	2	Started with active yeast 9   1.34   0.14			very strong	1.1
IV	1.5	Started with active nutrition solution 0.33   0.88   0.63			very strong	4.3
	23	0.78   1.48   1.61			very strong	56.5
V	22	Started with active nutrition solution 0.64   1.19   0.96			very strong	166.8
	22	0.73   1.14   0.85			very strong	174.5

The results of our experiments are seen in Table 2. In columns 3, 4 and 5, data on the distribution of  $^{42}\text{K}$  between yeast and nutrient solution are given. In those cases, in which non-labelled yeast was placed in labelled nutrient solution, the ratio of the

<sup>1</sup> In the first mentioned case we start with radioactive nutrition solution, in the second case with radioactive yeast.

<sup>2</sup> Due to increase respectively decrease in the potassium content of the yeast.

$^{42}\text{K}$  content of yeast and nutrient solution of equal volumina is stated. In the converse cases, the ratio of the  $^{42}\text{K}$  content of nutrient solution and yeast is given.

In column 3, the values of the distribution coefficient of  $^{42}\text{K}$  are to be seen which we should expect to be present in the case that no exchange of potassium between yeast and nutrient solution took place. Due to the increase of the potassium content of the yeast during fermentation,  $^{42}\text{K}$  will *accumulate* in the yeast even in a total absence of potassium *exchange* between yeast and nutrient solution. If we denote the increment in the potassium content of the yeast by  $a$  and the original  $^{42}\text{K}$  content of the nutrient solution by  $b$ , the ratio of the  $^{42}\text{K}$  content of the yeast and the nutrient solution will work out to be  $\frac{a}{b-a}$ .

In this calculation, the absence of a potassium exchange between yeast and nutrient solution is assumed. In a similar way, the corresponding figures are calculated in those cases in which labelled yeast is placed in non-labelled nutrient solution, in which a decrease will also lead to a change in the  $^{42}\text{K}$  content of the yeast without any potassium exchange taking place between yeast and nutrient solution.

In column 4, the distribution coefficient is stated which we should expect in the case of a full interchange taking place between yeast potassium and nutrient solution potassium. The figures are calculated from the data of the chemical analyses. In the case of a full interchange, the ratio of the  $^{42}\text{K}$  and of the total potassium content of the yeast and the nutrient solution must obviously be the same.

In column 5, the values found for the distribution coefficient are stated.

If no exchange took place the values of column 5 should correspond to the values of column 3 while, in the case of a full interchange, the values of column 5 would correspond to the values of column 4. In the case of a partial interchange, the values of column 3 would lie between the corresponding values of column 3 and column 4. The difference between the values of columns 4 and 5 will decrease with increasing interchange. Since, with increasing interchange, the  $^{42}\text{K}$  content of the nutrient solution, respectively of the yeast, is getting more and more "diluted" by non-active potassium moving in the opposite direction we shall underestimate the extent of the interchange

in the case of a strongly pronounced interchange. In this case, the interchange is in fact markedly larger than indicated by the figures of column 5.

In experiments II and IV, one of the values found experimentally is larger than the value expected in the case of a total interchange. This result may be due to experimental errors, an alternative explanation being the following. In the earliest phase of the experiment, potassium of very high specific activity penetrates into the yeast where it gets partly incorporated in a comparatively stable compound which does not get renewed during the experiment.

### Conclusions.

As seen in Table 2, already in the course of 2 hours a proportional partition of  $^{42}\text{K}$  between nutrient solution potassium and yeast potassium is obtained, indicating that a full interchange has taken place between the potassium present in the solution and the potassium present in the yeast cells in experiment II, in which the yeast has shown a very strong fermentation. In experiment III, in which the fermentation was much weaker, the extent of exchange was a very restricted one. In experiment I, in which only a slight fermentation took place, about half of the yeast potassium interchanged with solution potassium. In experiments taking 22 and 23 hours, respectively, (IV and V), most potassium exchanged.

In all these experiments, the partition of  $^{42}\text{K}$  added to the nutrient solution between yeast and solution was followed. In another set of experiments, the opposite was the case. We have grown yeast in a solution containing  $^{42}\text{K}$  and suspended the yeast in a nutrient solution containing inactive potassium. In the course of 2 hours, only, a slight interchange took place (II and III); in the course of 20 hours (I), a very appreciable interchange was observed; after the lapse of 44 hours (I), the interchange was complete. In the two last mentioned cases the fermentation was very strong; in the two first mentioned cases the fermentation was restricted.

A survey of the figures obtained suggests that fermentation promotes interchange between cellular potassium and potassium present in the solution. This result can be interpreted by assuming that potassium permeates the cell wall of the fer-

menting yeast easier than the cell wall of non-fermenting yeast. An alternative and not less probable explanation is the following: We assume that potassium is partly present in the yeast cells in chemical binding and that the organic compounds containing the potassium degenerate and get resynthesized constantly, and it is in the course of the last mentioned process that  $^{42}\text{K}$  has opportunity to be incorporated into the potassium compounds. It is to be expected that, during intense fermentation, the process of renewal of the potassium compounds, which is presumably intimately connected with the metabolic processes going on in the yeast cells, will be strongly enhanced and, correspondingly, the incorporation of  $^{42}\text{K}$  in the organic compounds will be accelerated. On this view, it is not so much an increase in the permeability of the cell membrane during intense fermentation which is responsible for the enhanced potassium exchange but the accelerated metabolic rate inside the cell.

It is of interest to remark that PULVER and VERZÁR (1941) recently found that there is an intimate connection between carbohydrate metabolism and potassium uptake denoted in this note as "additional uptake" of potassium in contrast to potassium exchange. They found a large amount of potassium to enter the yeast cells after addition of glucose, the potassium leaving again to a large extent after fermentation starts. This behaviour is presumably due to an incorporation of potassium into the intermediary products of the formation of polysaccharides. When fermentation starts, due to the decomposition of these products, the free potassium content of the yeast cells increases. Such an increase is bound to lead to an exodus of cellular potassium and, since, as shown in this note, the membrane of the yeast cell is easily permeable to potassium ions the excess free potassium will soon leave the yeast cells.

### Summary.

The interchange of potassium between yeast and nutrient solution was investigated by using radiopotassium ( $^{42}\text{K}$ ) as an indicator.

In strongly fermenting yeast, a full interchange was found to take place between the potassium of the yeast and the potassium of the nutrient solution in the course of 2 hours. In most



experiments in which the fermentation was slight, a much slower potassium exchange was observed.

The effect of fermentation on the rate of potassium exchange is possibly not so much due to an increase in the permeability of the yeast cell membrane to potassium as to an enhanced rate of resynthesis of potassium containing compounds under fermentation. Such a process will lead to an acceleration of potassium interchange.

#### Literature.

- HEVESY, G., K. LINDERSTRØM-LANG and N. NIELSEN, *Nature*, Lond. 1937, *140*, 726.
- KOLTHOFF, J. M., and G. H. BENDIX, *Industrial and Engineering Chemistry, Analyt. Ed.* 1939, *11*, 94.
- PULVER, R., and F. VERZÁR, *Helv. chim. Acta* 1940, *23*, 1087.
- WINKEL, A., and H. MAAS, *Angw. Chemie*, 1936, *49*, 827.
-

From the Steno Memorial Hospital, Gentofte, Aarhus Amtssygehus, Medical Department, and the Biochemical Institute of Aarhus University.

## On the Determination of the Vitamin B<sub>1</sub> Content of Urine. A modification of the thiochrome method.<sup>1</sup>

By

K. WASSMANN.  
Aarhus, Denmark.

---

Some of the hitherto published methods for determining vitamin B<sub>1</sub>, by oxidation to thiochrome and measuring the resulting fluorescence (JANSEN, 1936, WESTENBRINK, 1937—38, KARRER 1937 a and b, CERECEDO 1937, RITSERT 1938 a, b, 1940 and WANG 1939) have been tried by the author. But when the determinations were made on urine, the results were not reproducible.

The purpose of the present investigations has therefore been to work out a reliable and comparatively quick and simple method for the determination of B<sub>1</sub> in urine, as such determinations must be considered of importance for the understanding of the physiology and clinic of vitamin B<sub>1</sub>.

From the following it will be seen that if the modification of the thiochrome method described by WANG and HARRIS is altered at certain points, it may be used for the determination of vitamin B<sub>1</sub> in urine.

As the present investigations are based on the WANG and HARRIS' method, which we cannot assume to be commonly known, their procedure is given in extenso:

(1) *Preliminary washing.*<sup>2</sup> Measure 5—8 ml of urine into a 15 ml graduated centrifuge tube, add an equal volume of isobutanol and 2

<sup>1</sup> Received 3 June 1941.

<sup>2</sup> For routine determinations this step is not usually necessary, but for accurate work and with certain urines containing large amounts of interfering substances it is desirable (and may be essential) to give the urine this preliminary washing. With an occasional specimen a second and even third washing may be necessary.

drops of 10 per cent HCl. Shake vigorously for 2 minutes and centrifuge. Note the final volume of the aqueous layers. Discard the isobutanol layer.

(2) *Oxidation.* Measure three 1—2 ml portions of the extracted urine, depending on the concentration of vitamin B<sub>1</sub> in it, into 3 graduated glass-stoppered cylinders of 25 ml capacity. Add to each 2 ml of CH<sub>3</sub>OH. To the first 2 of these cylinders add 1 ml of 30 per cent. NaOH and mix. To the first cylinder add 2 per cent K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> from a graduated pipette cautiously drop by drop, shaking between each addition until the colour is just slightly more yellow<sup>1</sup> than in the second cylinder, which has no K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, and is to be used subsequently as a control. The slight colour should stay for at least 1/2 minute. Notice the volume of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> so required. Add exactly the same amount of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> to the third cylinder (i. e. the one without NaOH), mix, and then add 1 ml of 30 per cent. NaOH. Mix and allow to stand for 1 minute. Cylinder no. 1, used to determine the amount of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> needed, is not further required.

(3) *Extraction of thiochrome.* Add 10 ml of isobutanol to both cylinders nos. 2 and 3, and shake vigorously for 2 minutes and allow the layers to separate.

(4) *Washing and drying.* Cylinders nos. 3 ("unknown", with ferricyanide) and 2 (control, without ferricyanide) are now treated identically as follows. Remove the bottom (aqueous) layer, with a long pipette fitted with a rubber teat. Add 4 ml of water to each cylinder and shake vigorously for 1 minute. Again allow the layers to separate. Make up the isobutanol layer to 15 ml with fresh isobutanol and remove it to a dry conical flask. Add gradually approximately 4 g. of anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each flask, shaking during the addition; filter through the isobutanol-extracted filter papers<sup>2</sup> into clean dry test tubes and take 10 ml of the clear filtrates for comparison of fluorescence. (Alternatively, in place of the drying with sodium sulphate the solution may be clarified by addition of 1 ml of ethanol and the filtration omitted).

(5) *Comparison of fluorescence.* Place the two test-tubes side by side in front of the Wood's glass window of the ultra-violet lamp, inclining them towards the body at an angle of approximately 60° to the horizontal so that the eye can look into the tubes. Add the standard (see below) little by little from a graduated pipette to the control until the fluorescence exactly matches the unknown. Add to the "unknown" isobutanol equal in volume to the amount of the standard added to the control, so as to make the final volume of the two tubes the same. The contents of the tubes may be mixed after each addition by pouring backwards and forwards into another dry test tube. From the volume of the standard used the content of aneurin can be

<sup>1</sup> Avoid an excess of ferricyanide. This is very important and should be carefully carried out; otherwise it will be impossible to get a perfect match of fluorescence.

<sup>2</sup> Filter papers, extracted with isobutanol for not less than 12 hours in a Soxhlet apparatus, until found to be free from fluorescent substances in blank determinations.

calculated, e. g. if  $x$  = the no. of ml used of standard, having a concentration of  $y$  micrograms per ml,  $v$  = the volume of urine used,  $V$  = the total output of urine per 24 hours, the aneurin content of the urine =  $xy : 10 \times V : v$  micrograms in the 24-hour specimen.

### Author's own Investigations.

The WANG and HARRIS' method proved very useful for determining the aneurin contents of pure aqueous solutions. In about 60 analyses on solutions containing 0.01—0.75  $\gamma$  per ml the difference between the calculated and the determined values was in no case more than + 10 per cent.

When, however, the method was tried systematically on urine, a number of useful technical modifications were introduced, which are briefly described below.

1) *Preliminary test.* It is the object of the preliminary test to determine how much potassium ferricyanide is necessary for optimal oxidation of aneurin to fluorescent thiochrome. In pure aneurin solutions variations in the quantity of potassium ferricyanide are of practically no importance; only when a considerable excess of  $K_3Fe(CN)_6$  is added further oxidation may lead to the formation of a non-fluorescent compound of aneurin (as shown by JANSEN 1936).

In the case of urine this is not so. Different urines contain varying amounts of non-specific reducing substances and therefore require equally varying amounts of oxidising substance. Some authors have totally neglected this fact and use the same quantity of  $K_3Fe(CN)_6$  for all urines, so it was very creditable that WANG and HARRIS (1939) (and RITSERT 1940) introduced a preliminary test in order to determine how much  $K_3Fe(CN)_6$  is necessary for each analysis.

For the control of this preliminary test I have made a long series of experiments in which I tried to recover known quantities of aneurin that had been added to urine, and it may be briefly said that these experiments have shown that the said preliminary test is not reliable, as it was only exceptionally that the added aneurin was recovered quantitatively.

This turned out to be due to the fact that the amount of potassium ferricyanide indicated by WANG and HARRIS' preliminary test was nearly always too small; optimal oxidation is not obtained when the urine after the addition of potassium ferri-

cyanide is "just slightly more yellow" than the control, not until the addition of the potassium ferricyanide causes a very intense yellow colouring. Moreover, in the work of WANG and HARRIS the quantities of potassium ferricyanide used are not stated. RITSERT states that for 2.5 ml urine he uses 1 to 2 ml 1 per cent  $K_3Fe(CN)_6$ . According to my experience this quantity is usually too small (vide tables below).

Instead of the above preliminary test the following procedure was found suitable by the author. The urine is made alkaline and potassium ferricyanide is added in excess, the sample is then allowed to stand till oxidation has taken place (2 minutes at room temperature). The urine is now acidified and using Cetopalin as indicator the liberated potassium ferrocyanide is titrated with ceriumsulphate. The necessary amount of ceriumsulphate corresponds closely to the quantity of potassium ferricyanide used to the oxidation.

Table I gives the titration figures for 10 samples of urine oxidised with 75, 100, 125 and 150 per cent of the amount of potassium ferricyanide determined in this manner; further the table contains corresponding figures for the same urines after the addition of known quantities of aneurin (1 ml of a 1  $\gamma$  per cent solution usually being added to 9 ml urine); the calculated titration figures of the latter urines have also been recorded.

If agreement between the determined and the calculated titration figures of the urinary samples to which aneurin has been added (columns D and E of the table) is considered a criterion that the amount of potassium ferricyanide used is "optimal", it will be seen that the amount must lie between 100 and 125 per cent of the amount determined by the preliminary test. This is verified by table II in which 10 other urines chosen at random have been put down; they were oxidised with 110 per cent of the amount of potassium ferricyanide determined by the preliminary test. It is seen that in all samples there is excellent agreement between the calculated and the analysed values.

Besides the variations in technique due to this new form of the preliminary test as described above, the following, less important, modifications have been found useful:

II: Ordinary non-graduated centrifuge tubes are used. The necessity of using graduated tubes is not evident from WANG and HARRIS' description.

III: From the time of the preliminary test until the final centrifuging the whole procedure is carried out in a separatory funnel.

Table I.

Nr.	A	B	C	D	E
1	0.80	0.60	1.22	1.60	2.10
		0.80	1.61	2.15	2.45
		1.00	1.60	2.40	2.44
		1.20	1.55	1.75	2.39
2	1.00	0.75	1.89	2.45	2.70
		1.00	2.43	3.20	3.19
		1.25	3.00	3.05	3.70
		1.50	3.10	3.20	3.79
3	2.25	1.69	4.11	4.20	4.70
		2.25	4.89	5.10	5.40
		2.81	4.90	5.20	5.41
		3.37	5.70	5.60	6.13
4	2.50	1.88	1.15	1.65	2.02
		2.50	1.90	2.55	2.71
		3.12	1.90	2.10	2.71
		3.75	2.00		
5	2.20	1.65	1.75	1.85	2.57
		2.20	3.30	4.20	3.97
		2.75	3.70	4.20	4.33
		3.30	4.40	4.50	4.96
6	1.35	1.01	1.55	1.75	2.39
		1.35	1.70	2.25	2.53
		1.69	2.35	3.10	3.11
		2.02	2.45	2.40	3.20
7	2.90	2.17	1.44	2.00	2.30
		2.90	2.20	2.70	2.98
		3.63	2.40	3.02	3.16
		4.35	2.90	3.20	3.61
8	1.80	1.35	2.07	2.57	2.86
		1.80	3.30	4.00	3.97
		2.25	3.35	4.60	4.01
		2.70	3.80	3.90	4.32
9	1.40	1.05	1.05	1.35	1.94
		1.40	1.35	2.25	2.21
		1.75	1.85	2.45	2.66
		2.10	2.35	2.35	3.21
10	1.75	1.31	1.50	1.65	2.35
		1.75	1.90	2.40	2.71
		2.19	1.80	2.40	2.62
		2.63	2.00	2.00	2.80

A: the amount of 1/25 n potassiumferrieyanide necessary for oxidation as determined by the preliminary test, expressed in ml, B: the amount of potassiumferrieyanide used for oxidation, C: titration figures for urine without addition of aneurin (i. e.: the number of ml "standard" used for titration), D: titration figures for urine to which a known quantity of aneurin has been added, E: calculated titration figures for urine after addition of a known quantity of aneurin.

Table II.

Nr.	A	B	C	D	E
11	0.95	1.05	1.45	2.35	2.30
12	1.85	2.04	2.25	2.90	3.02
13	1.18	1.30	1.65	2.45	2.48
14	1.90	2.09	2.50	3.15	3.25
15	1.20	1.32	2.15	2.85	2.97
16	3.00	3.30	2.85	3.45	3.56
17	1.90	2.09	1.95	2.80	2.75
18	1.10	1.21	2.15	2.85	2.92
19	1.25	1.38	1.95	2.75	2.75
20	1.15	1.27	1.65	2.55	2.48

A: the amount of  $1/25$  n potassiumferrieyanide necessary for oxidation as determined by the preliminary test, expressed in ml, B: the amount of potassiumferrieyanide used for oxidation, C: titration figures for urine without addition of aneurin (i. e.: the number of ml "standard" used for titration), D: titration figures for urine to which a known quantity of aneurin has been added, E: calculated titration figures for urine after addition of a known quantity of aneurin.

IV: All 15 ml isobutanol are added at once, which must be considered more accurate than addition in two lots as indicated by WANG and HARRIS.

V: The isobutanol solution to be used for final titration is centrifuged whereby the use of filterpaper and the laborious task of freeing the paper of fluorescent substances is completely avoided.

VI: When titrating with the procedure used by the author it was found that the addition of isobutanol to the "test" with the addition of standard to the "blank", as indicated by WANG and HARRIS, were of no importance and this part was therefore omitted.

VII: It is often difficult to decide the exact point when fluorescence is the same in both tubes. The titration is therefore carried to the point when the "blank" fluorescences just perceptibly more than the "est", when the tubes are changed over, and a few drops of the standard are added to the "test", until the fluorescence of the latter is again the stronger.

The modified procedure is now as follows:

### Technique.

I. *Washing.* The urine is acidified with a few drops of 25 per cent HCl to a  $p_H$  of about 3 (bromphenolblue indicator paper). Urine is placed in two 15 ml centrifuge tubes — not quite half way; equal parts of isobutanol are added, the tubes

shaken vigorously for 2 minutes and afterwards centrifuged for about 1 minute at about 3,000 rev. per minute. The isobutanol is drawn off with a water suction pump. The procedure is repeated once or twice, depending on the colour intensity of the urine.

II. *Preliminary test.* 2 ml washed urine are measured into a porcelain dish, and 2 ml methylalcohol are added, followed by 3 ml  $n/25$  potassium ferricyanide + 1 ml 30 per cent NaOH. The sample is allowed to stand for 2 minutes, and then 4 ml 50 per cent sulphuric acid and 10 drops of a 0.1 per cent solution of Cetopalin C in distilled water (this solution will only keep for 3 days) are added. Titration is now carried out with  $1/50$  n ceriumsulphate in 5 per cent sulphuric acid until the pure yellow colour changes to orange-red. If, say, for this titration a ml ceriumsulphate were used, the amount of potassium ferricyanide necessary for oxidation is  $a/2 + 10\%$  ml (= b). If more than 6 ml ceriumsulphate were required for the titration, the preliminary test is repeated on a sample of urine which has been diluted with equal parts of water.

III. *Oxidation.* 2 ml of the washed urine and 2 ml methyl alcohol are measured into each of two cylindrical 50 ml separatory funnels with glass stoppers, A and B. b ml  $1/25$  n potassium ferricyanide are added to B, and immediately after 1 ml 30 per cent NaOH is measured into both funnels. The samples are left to stand for 2 minutes. 15 ml isobutanol are added to both and they are shaken vigorously for 2 minutes, after which they are left to stand till the layers have distinctly separated (a few minutes). The water layer is drawn off and 4 ml distilled water are added. The separatory funnels are again shaken vigorously for 1 minute and left again till the layers have separated and the water is again drawn off. The isobutanol is dehydrated by gradually adding 4 grammes of H<sub>2</sub>O-free sodium sulphate, while shaking. The isobutanol solution is poured into centrifuge tubes and centrifuged. 10 ml A ("blank") and 10 ml B ("test") are measured into equally graduated, fluorescence-free tubes and are now ready for titration. The "standard" is prepared in a similar manner: 2 ml of a 1  $\gamma$  per cent solution of aneurin hydrochloride (which will keep in the refrigerator for several months) are measured into a separatory funnel; 2 ml methyl alcohol, 1 drop of potassium ferricuanide and 1 ml NaOH are added;



the "standard" is allowed to stand, is washed, dried, etc. as above. In this way each ml will contain 0.133  $\gamma$  thiochrome.

The standard is prepared fresh every day.

IV. *The titration.* Titration is carried out in the dark room; the tubes are placed side by side at an angle of 30° to the vertical about 10 cm from the mercury-quartz lamp (Philips H. P. W. 75). The solutions are viewed from the mouth of the test tubes. The "standard" is now added from a microburette until the "blank" fluorescence is just more than the "test"; the tubes are changed over, and a few drops are added to the "test", until the fluorescence of the latter is again the stronger. Half the difference between the figures is deducted from the first figure; this gives the titration figure (x). *Calculation.* The quantity of urine used for analysis is 1.33 ml ( $2 \times 10:15$ ); a certain amount of urine (y ml) must then contain  $x \times y \times 0.133:1.33 = x \times y:10 \gamma$  aneurin.

Urines with a large concentration of aneurin (e. g. following tolerance tests) should be diluted, so that not more than 4—5 ml standard are used for titration, because if more is used the accuracy of the titration decreases.

*Discussion and results:* The decisive proof that the "titration figures" obtained with the above method actually are a measure of the vitamin B<sub>1</sub> contents of the urines analysed can probably only be given by biological control experiments. But the following three facts show that the probability of this presumption is indeed very great:

1) If aneurin is added to urine, it may be recovered quantitatively, as shown in the tables II and III, and as may be seen from the following analyses of 2 urines, to which aneurin has been added in varying amounts:

	I	II	III	IV
A	2.85	3.45 (3.56)	4.75 (4.56)	5.45 (5.56)
B	1.60	2.50 (2.44)	3.35 (3.44)	4.30 (4.44)

Titration values (calculated figures in brackets).

- I: Urine without addition of aneurin,  
 II: 9 ml urin + 1 ml of a 1  $\gamma$  per cent solution of aneurin,  
 III: 9 ml urin + 1 ml of a 2  $\gamma$  per cent solution of aneurin,  
 IV: 9 ml urin + 1 ml of a 3  $\gamma$  per cent solution of aneurin.

2) Administration by mouth or parenterally of aneurin to normal individuals causes a regular increase in the titration values for the urine (a report on investigations in this field will appear later).

3) Six urinary samples with titration figures corresponding to a vitamin B<sub>1</sub> content of 1.35—4.39  $\gamma$  per cent were heated in the autoclave at 132° C. for 5 hours, after which the titration figures were again determined. Theoretically the titration figures should hereby fall to 0, if they were alone due to the urinary contents of vitamin B<sub>1</sub>. In the six samples in question the decrease was 93—90—85—88—100 and 89 per cent respectively of the titration values before heating in the autoclave. This suggests that about 90 per cent of the fluorescence measured originates from vitamin B<sub>1</sub>. On the other hand, it may be, accordingly, that the method has a systematic error, the values determined being about 10 per cent higher than corresponding to the true vitamin B<sub>1</sub> contents of the urine.

The accuracy of the method used is determined statistically from the results of repeated determinations on the same urine, as shown in the following two examples:

Titration figures for C:	1.15	1.07	1.11	1.10	1.15	1.15	1.14
"    "    "    D:	0.50	0.50	0.55	0.55	0.52	0.52	0.52

This gives a standard deviation on each observation of 0.0206 for C and a variation coefficient of 3.58 and for D a standard deviation of 0.1315 and a variation coefficient of 2.93, which means that the analytical error hardly exceeds  $\pm 10$  per cent. A comparison between the figures determined by analyses and the calculated figures in Tables II and III gives the same result.

As a general rule it is recommended to make duplicate determinations; with some practice such a determination may be made in 1 to 1½ hours.

For the sake of comparison analyses have been made on 10 urines chosen at random, partly by the method of WANG and HARRIS (I) partly by the author's method (II) — 1/25 n potassiumferricyanide being used in both cases for the sake of comparison. The results have been recorded in Table III. It may be seen: a) that in method II more K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> is used than in method I, b) method II results in higher titration values than I. e) Added aneurin may be recovered quantitatively by method II, but not by I.

Table III.

Nr.		A	B	C	D	E
21	I	0.40	0.40	2.15	2.55	2.97
	II	1.00	1.10	2.35	3.15	3.11
22	I	0.20	0.20	0.65	1.15	1.58
	II	1.15	1.60	1.45	2.15	2.20
23	I	0.25	0.25	1.15	1.42	2.03
	II	2.35	2.59	2.40	2.95	3.16
24	I	0.25	0.25	2.76	2.90	3.48
	II	1.05	1.16	3.20	3.72	3.88
25	I	0.24	0.24	0.59	1.25	1.53
	II	1.15	1.27	1.05	1.91	1.94
26	I	0.20	0.20	0.30	0.50	1.27
	II	1.90	2.09	1.35	2.10	2.21
27	I	0.25	0.25	0.57	1.20	1.51
	II	1.20	1.32	0.80	1.85	1.72
28	I	0.25	0.25	0.35	0.65	1.31
	II	2.40	2.64	2.15	2.95	2.93
29	I	0.36	0.35	0.52	1.15	1.47
	II	1.60	1.76	1.10	1.82	1.99
30	I	0.15	0.15	0.35	0.45	1.31
	II	1.95	2.15	1.15	1.95	2.03

I: WANG and HARRIS' method. II: own method.

A: the amount of 1/25 n potassium ferricyanide necessary for oxidation as determined by the preliminary test, expressed in ml, B: the amount of potassium ferricyanide used for oxidation, C: titration figures for urine without addition of aneurin (i. e.: the number of ml "standard" used for titration), D: titration figures for urine to which a known quantity of aneurin has been added, E: calculated titration figures for urine after addition of a known quantity of aneurin.]

Of late a long series of publications dealing with determinations of the daily output of vitamin B<sub>1</sub> in urine have appeared, particularly from Germany. The vitamin has been determined by various modifications of the thiochrome method (vide e. g. WESTENBRINK 1937—38, KARRER 1937 b, RITSERT 1938 a, b, 1940, MAGYAR 1940). The results given vary within very wide limits; the physiological variations certainly seem to be large; but the great differences between the results of various investigators might also be caused by analytical errors; it is the hope of the author that the present work has helped to eliminate such errors. The lowest value stated is 17—64  $\gamma$  per day (GUHR 1939), the highest 90—480  $\gamma$  per day (WANG and HARRIS). In the experience of the author, so far very limited, the values are nearer to the latter figures than to the former.

### Summary.

After a thorough examination of different thiochrome test from the literature regarding determination of the B<sub>1</sub>-vitamin content in urine, it is shown, that the analytical results to a high degree depend on the amount of potassium ferricyanide used in oxidation.

When WANG and HARRIS' method is modified according to the author, aneurin can be determined in urine with an accuracy of  $\pm 10$  per cent.

### Literature.

- BAUCKE, J., *Klin. Wschr.* 1939. *33*. 1128.  
 CERECEDO, L. R., et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 1937. *59*. 1617.  
 FERREBEE, J. W., and G. A. CARDEN, *J. Lab. clin. Med.* 1940. *25*. 12. 1320.  
 GUHR, G., *Klin. Wschr.* 1939. *24*. 854.  
 HILLS, G. M., *Biochem. J.* 1939. *12*. 1966.  
 JANSEN, B. G. P., *Rec. trav. chim. Pays-Bas* 1936. *55*. 11. 1046.  
 KARRER, W., and U. KUBLI, *Helvet. chim. Acta.* 1937 a. *20*. 369.  
 KARRER, W., *Ibidem* 1937 b. *20*. 1147.  
 MAGYAR, Z. *Vitaminforsch.* 1940. *10*. 1. 32.  
 OTTO, H., and F. RÜHMEKORB, *Klin. Wschr.* 1938. *36*. 1246.  
 PEZOLD, F., and E. DITTMAR, *Ibidem.* 1940. *48*. 1234.  
 RITSERT, K., *Dtsch. med. Wschr.* 1938 a. *14*. 481.  
 —, *Klin. Wschr.* 1938 b. *40*. 1397.  
 —, *Ibidem* 1940. *19*. 446.  
 SCROEDER, H., *Ibidem* 1939. *5*. 148.  
 WANG, Y. L., and L. J. HARRIS, *Biochem. J.* 1939. *33*. 8. 1356.  
 WESTENBRINK, H. G. K., and J. GOUDSMIT, *Arch. Néerland. Physiol.* 1937. *22*. 319.  
 —, and — *Ibidem* 1938. *23*. 79.

---

With a grant from "Nordisk Insulinfond".

---

Aus dem physiologischen Institut der Universität Aarhus.

## Untersuchungen über die Permeabilität der roten Blutkörperchen bei normalen Menschen.<sup>1</sup>

Die Bedeutung von Alter, Blutgruppe  
und Schwangerschaft.

Von

SØREN L. ØRSKOV.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit beschrieben MELDAHL und ØRSKOV (1940) eine photoelektrische Methode zur Bestimmung der Permeabilität der roten Blutkörperchen. Die Methode ist eine Modifikation der von ØRSKOV (1935) angegebenen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Permeierung dem Fick'schen Gesetz nicht streng folgt. Bezüglich der Diskussion dieser Abweichung vom Fick'schen Gesetz sei auf die Arbeit von MELDAHL und ØRSKOV verwiesen. Es empfiehlt sich deshalb, die Zeiten anzugeben, die es nach Zugabe des permeierenden Stoffes nimmt bis bestimmte Konzentrationsunterschieden zwischen der Suspensionsflüssigkeit und der wässrigen Phase der Blutkörperchen erreicht sind, und daraus die Konstanten für die Permeierungsgeschwindigkeit, mit Hilfe des Fick'schen Gesetzes zu errechnen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Konzentrationsunterschiede gewählt: die Konzentration des permeierenden Stoffes in der wässrigen Phase der roten Blutkörperchen betrug jeweils  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{3}{4}$  der Konzentration der Suspensionsflüssigkeit; die entsprechenden Konstanten sind mit  $K_1$  und  $K_3$  bezeichnet.

In der besprochenen Arbeit wurde das Blut defibriniert, filtriert und mit 99 Teilen 0.9 % NaCl verdünnt; die Suspension

<sup>1</sup> Eingegangen am 4. Juli 1941.

blieb bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage (24 Stunden) stehen, da die Permeabilität des Blutes sich in den ersten Stunden verändert.

Da geplant war, die Untersuchungen in dieser Arbeit auch auf Versuche mit Patienten, evtl. auch Patienten aus anderen Städten, auszudehnen, wäre es bei solchen Versuchen von Vorteil, wenn man das defibrinierte Blut 24 Stunden stehen lassen könnte, bevor die Verdünnung vorgenommen wird.

Um zu untersuchen, ob man hierdurch andere Permeierungszeiten findet, wurden folgende Versuche vorgenommen:

10 normalen Versuchspersonen wurde Blut entnommen, das defibriniert wurde; von einem Teil der Blutprobe wurde sofort eine Suspension 1 : 100 in 0.9 % NaCl hergestellt. Die Suspension und das Blut blieben dann bis zum nächsten Tag bei Zimmertemperatur stehen; 1 Stunde vor der Permeabilitätsbestimmung wurde aus dem Rest des Blutes eine Suspension 1 : 100 in 0.9 % NaCl bereitet. Es zeigte sich, dass mit beiden Arten von Blutkörperchensuspensionen nahezu gleiche Ergebnisse gefunden wurden, sodass man mit der Herstellung der Suspensionen bis zum nächsten Tage nach der Blutentnahme warten kann.

Mit einer Glasspritze und rostfreier Kanüle werden 2—3 cm<sup>3</sup> Blut entnommen, das in ein ca. 15 cm<sup>3</sup> fassendes Zentrifugenglas entleert wird; es werden 3—4 grosse Glaskugeln hinzugegeben, das Zentrifugenglas mit einem Gummipfropfen verschlossen und einige Minuten kräftig geschüttelt bis das Fibrin ausgefallen ist. Das Blut bleibt nun bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage stehen, worauf es durch einen kleinen Wattebausch filtriert und die Suspension auf folgende Art hergestellt wird: 1 cm<sup>3</sup> Blut wird mit 98 cm<sup>3</sup> 0.9 % NaCl und 1 cm<sup>3</sup> Sorensen Phosphatpuffer von p<sub>H</sub> 7.3 verdünnt. Zur NaCl-Lösung wurde redestilliertes, kohlenstoffsaurefreies Wasser verwendet. Die Suspension wird 1 Stunde vor Gebrauch hergestellt.

Bezüglich der weiteren Methodik sei auf eine frühere Arbeit (ØRSKOV 1935) verwiesen.

Gleichzeitig mit der Blutentnahme wird auch der Hämoglobingehalt, Hämatokritwert und in den meisten Fällen auch die Blutgruppe bestimmt.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde die Permeierung von 6 verschiedenen Stoffen an der gleichen Blutprobe untersucht. Es handelt sich um Glycerin, Thioharnstoff, Ammoniumazetat, Hexamethylentetramin, Malonamid und Glukose.

Glycerin, Thioharnstoff, Malonamid und Glukose habe ich in früheren Versuchen angewandt.

Ammoniumazetat habe ich auch in einem einzelnen Versuch

benutzt (ØRSKOV 1934); dieser Stoff zeichnet sich dadurch aus, dass er das einzige Ammoniumsalz ist, das ich gefunden habe, welches durch die Anwesenheit von Kohlensäure und Bicarbonat nicht nennenswert beeinflusst wird. Ammoniumazetat wird der Blutkörperchensuspension in einer Konzentration zugesetzt, dass die Gefrierpunktserniedrigung die Gleiche wie bei 1 mol Harnstoff ist (die übrigen Stoffe sind in 1 mol Lösungen der Blutkörperchensuspension zugesetzt).

Es sei erwähnt, dass man nicht damit rechnen kann, dass Ammoniumazetat wie z. B. Glycerin permeiert. Man kann mit Wahrscheinlichkeit annehmen, dass das was man misst die Permeierungsgeschwindigkeit der Azetat-Ionen ist, dies kann man aber nicht mit Sicherheit sagen, und der Grund, warum dieses Salz verwendet wurde, war festzustellen, ob individuelle Unterschiede in der Permeierungsgeschwindigkeit eines Salzes bestehen.

Hexamethylentetramin wurde deshalb untersucht, weil es einen anderen chemischen Aufbau als die übrigen verwendeten Anelektrolyte hat. Es zeigte sich, dass die mit diesem Stoff erhaltenen Ergebnisse sehr schwankend sind. Unter anderem ist die Permeierung dieses Stoffes sehr  $p_H$ -empfindlich, da Hexamethylentetramin bei mehr alkalischer Reaktion langsamer permeiert.

Die Versuche wurden bei ca.  $20^\circ$  vorgenommen; hat die Versuchstemperatur eine Abweichung von mehr als  $0.2^\circ$ , sind die Werte korrigiert, wobei mit einem  $Q_{10}$  von 2 gerechnet wurde, mit Ausnahme von Glukose; hier wurde mit einem  $Q_{10}$  von 5.25 gerechnet.<sup>1</sup>

Die angewandten Lösungen stehen nach der Zubereitung im Eisschrank bei  $3-4^\circ$ , vor dem Versuch werden dieselben auf Zimmertemperatur erwärmt. Wenigstens alle 14 Tage werden die Lösungen erneuert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 1—6 dargestellt. Für jeden der 6 untersuchten Stoffe ist  $K_1$  und  $K_2$  für die 50 untersuchten, normalen Personen beiderlei Geschlechtes im Alter von 11—80 Jahren angegeben.

<sup>1</sup> Die Apparatur ist nun derart verändert, dass die Temperatur sehr selten mehr als  $0.2^\circ$  von  $20^\circ$  abweicht; an Stelle der Glasküvette für die Blutkörperchensuspension wird eine Zellophanküvette verwendet, die aus einer glatten Vor- und Rückwand aus Zellophan besteht, zwischen welchen ein U-förmiges, verzinntes Kupferrohr in das Zellophan eingegossen ist, durch das Wasser von konstanter Temperatur geleitet wird.

Zellophan beeinflusst die Blutkörperchen nicht, und die Suspension nimmt sehr schnell konstante Temperatur in der Küvette an.

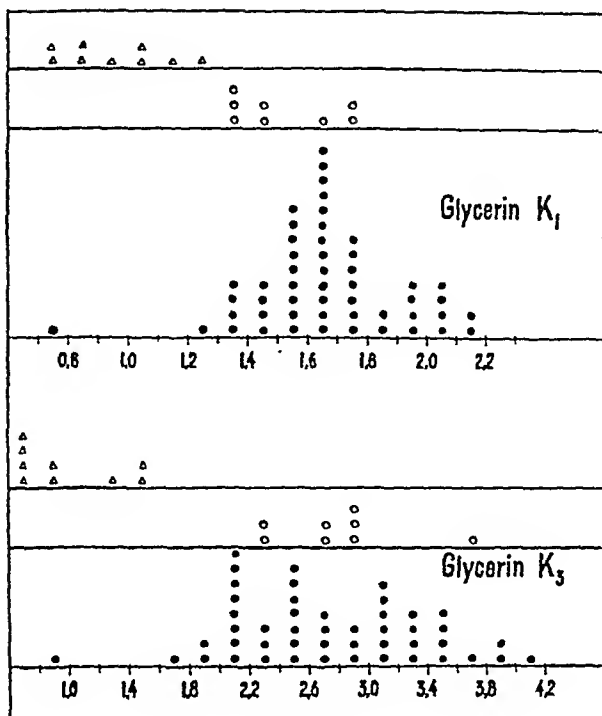


Abb. 1.

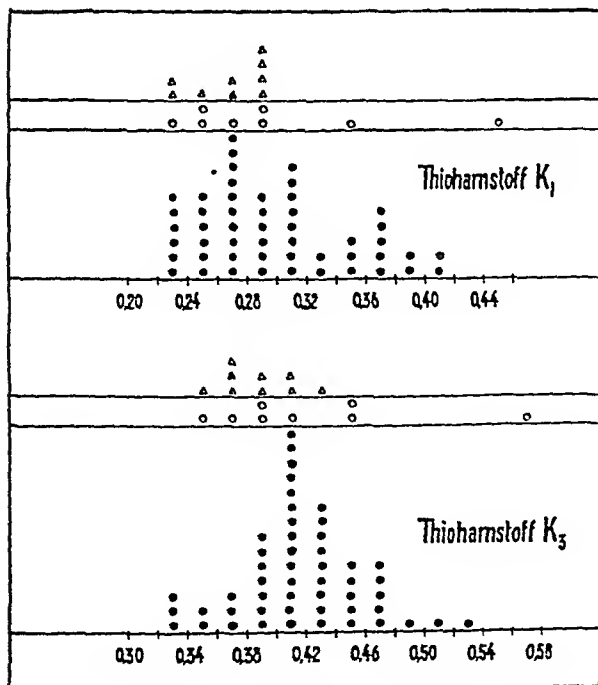


Abb. 2.



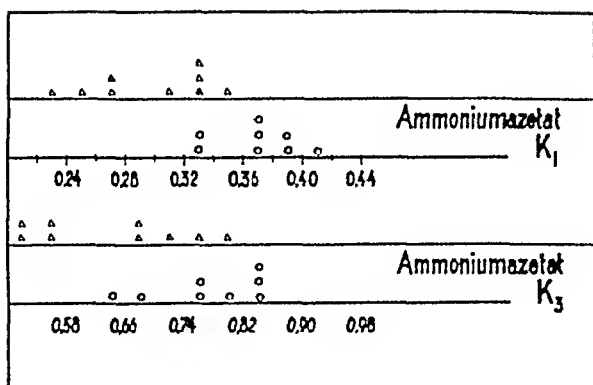


Abb. 3.

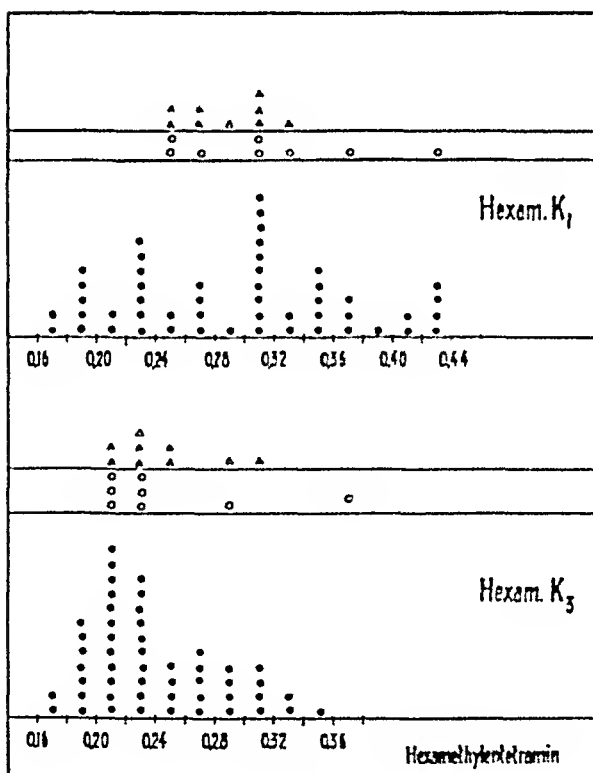


Abb. 4.

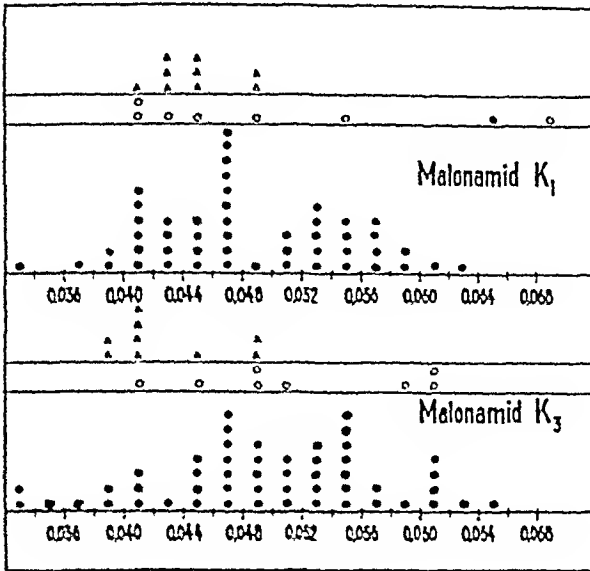


Abb. 5.

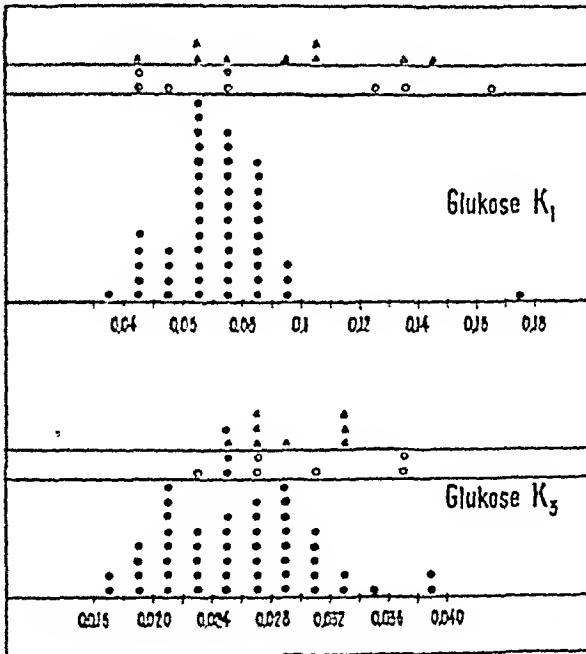


Abb. 6.

Abb. 1—6 geben die Minutenkonstanten für normale Menschen an. Die Konstanten sind der Übersichtlichkeit halber in Säulen angeordnet, und werden auf der Abszisse abgelesen.

● = normale im Alter von 11—80 Jahren.

○ = gebärende Frauen.

△ = neugeborene Kinder (Nabelschnurblut).

Da Alter, Geschlecht und Blutgruppe die Permeierungsgeschwindigkeit nicht zu beeinflussen scheinen, wurden diese Daten in den Tabellen nicht berücksichtigt.

Zur Erleichterung der Übersichtlichkeit sind die Konstanten für die einzelnen Personen in Säulen von runden Flecken gesammelt und umfassen z. B. für Glycerin einen Unterschied in den Konstanten von 0.2 und für Ammoniumazetat von 0.02. Zu oberst in den Abbildungen sind die Konstanten für die Permeabilitätsänderungen vom Blut gebärender Frauen und neugeborener Kinder zu sehen. Die Werte der Mütter sind als Kreise, die der Kinder als Dreiecke eingezeichnet. Diese Versuche sind nicht zahlreich; die erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch eine eingehendere Untersuchung als wünschenswert erscheinen.

Bei allen Stoffen findet sich eine recht erhebliche Streuung für die Konstanten. Wenn diese nicht durch die Methodik bedingt ist, lässt dies darauf schliessen, dass sich grosse individuelle Unterschiede in der Permeierung der untersuchten Stoffe finden. Frühere Untersuchungen (ØRSKOV 1937) liessen ein derartiges Ergebnis erwarten. Beim Kaninchen zeigten sich für Glycerin erhebliche individuelle Schwankungen in der Permeierungsgeschwindigkeit; bei Thioharnstoff hingegen wurde dies nicht festgestellt. Die Versuche von BANG und ØRSKOV (1937) zeigten bei normalem Versuchsmaterial recht bedeutende, individuelle Unterschiede.

Es besteht indessen kein Zweifel, dass Permeabilitätsversuche in der Art der hier vorgenommenen sehr empfindlich sind. Das Blut kommt in Berührung mit der Spritze, Kanüle und Küvette, und es ist schwierig die Lösungen hinsichtlich Zusammensetzung und  $p_H$  konstant zu halten. Es wurde früher gezeigt, dass Spuren von Kupfer (JACOBS und CORSON 1934) oder Blei (ØRSKOV 1935b) eine Veränderung der Permeabilität verursachen; die Anwesenheit anderer Stoffe kann möglicherweise das Gleiche bedingen.

Ob Blei die Permeierung von Anelektrolyten beeinflussen kann ist zwar nicht festgestellt, aber da gewöhnliches Glas Blei abgibt, ist zum Schutze der Blutkörperchen, der Suspension eine geringe Phosphatmenge zugesetzt, die ausreichend ist, die Bleiwirkung zu verhindern.

Um sich zu sichern, dass die gefundenen Unterschiede in der Permeierungsgeschwindigkeit reell sind, wurde das Blut von 3 Personen in Reihen von Blutproben untersucht, deren Entnahme sich über einen Monat erstreckte. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle I.

		Glycerin	Thioharnstoff	Ammoniumazetat	Hexametylen-tetramin	Malonamid	Glukose
R	K <sub>1</sub>	1.64 ± 0.04	0.802 ± 0.014	0.449 ± 0.024	0.812 ± 0.041	0.0527 ± 0.0022	0.099 ± 0.0045
	K <sub>2</sub>	2.51 ± 0.12	0.442 ± 0.015	0.885 ± 0.036	0.261 ± 0.010	0.0531 ± 0.0032	0.0315 ± 0.0018
L	K <sub>1</sub>	1.01 ± 0.065	0.251 ± 0.0086	0.425 ± 0.011	0.305 ± 0.024	0.0431 ± 0.0020	0.0636 ± 0.0036
	K <sub>2</sub>	1.16 ± 0.018	0.896 ± 0.0086	0.923 ± 0.033	0.266 ± 0.018	0.0443 ± 0.0020	0.0316 ± 0.0012
S	K <sub>1</sub>	1.57 ± 0.011	0.246 ± 0.010	0.417 ± 0.029	0.253 ± 0.013	0.0418 ± 0.0014	0.0599 ± 0.0017
	K <sub>2</sub>	2.52 ± 0.011	0.838 ± 0.011	0.882 ± 0.024	0.248 ± 0.013	0.0435 ± 0.0028	0.0247 ± 0.0010
N	K <sub>1</sub>	1.65 ± 0.26	0.294 ± 0.050	0.586 ± 0.066	0.290 ± 0.073	0.0487 ± 0.0037	0.0708 ± 0.0201
	K <sub>2</sub>	2.70 ± 0.61	0.410 ± 0.014	0.80 ± 0.11	0.236 ± 0.044	0.0490 ± 0.0074	0.0255 ± 0.0058

In der Tabelle sind die Mittelwerte für die Konstanten der untersuchten Proben aufgeführt. Weiterhin ist für jede Versuchsperson und jeden Stoff der mittlere Fehler der Einzelmessungen berechnet. Dies ist nicht ganz korrekt, da die Abweichung vielleicht nicht durch einen Fehler bedingt ist, sondern durch Veränderungen der Kost, das Allgemeinbefinden u. s. w. verursacht ist; aber die Zahlen lassen eine Schätzung über die Grösse der Abweichungen zu, die man erwarten kann, wenn man ein Individuum über einige Zeit beobachtet.

Einige der gefundenen »grössten Abweichungen« sind jedenfalls durch die Methodik bedingt, dies ist bei Hexametylen-tetramin der Fall, das, wie erwähnt, ein Stoff ist, der besondere experimentelle Schwierigkeiten bietet.

Die Tabelle zeigt deutlich, dass individuelle Unterschiede in der Permeabilität bestehen.

Die 3 untersuchten Personen müssen als normal bezeichnet werden. »R«, eine Frau, hat jedoch eine leichte Anaemie (68 % Hb), die sich sehr schwierig durch Eisenbehandlung beeinflussen lässt, aber Anzeichen für eine perniciose Anaemie sind nicht vorhanden. Die Permeabilität von R's roten Blutkörperchen zeigt jedoch Werte, die den von BANG und ØRSKOV (1937) bei perniciose Anaemie mit schneller Permeierung (grossen Konstanten) für Glukose (besonders für K<sub>1</sub>), Thioharnstoff und Malonamid gefundenen entsprechen (9 Blutproben sind untersucht worden). Vier normale Versuchspersonen zeigen aber entsprechende Permeierungsgeschwindigkeiten für Glukose.

»L« (♂, Hb 99 %, 8 Bestimmungen) hat in der Permeierungsgeschwindigkeit eine sehr charakteristische Abweichung: Glycerin permeiert hier sehr langsam und zwar wesentlich langsamer als in irgend einem anderen Fall im Normalmaterial, ausgenommen bei neugeborenen Kindern.

$K_1$  und  $K_3$  liegen nahe beieinander. Diese langsame Permeierung hat sich über 2 Jahre unverändert erhalten. »S« ist ein Mann; Hb 92 % und 9 Blutpröben sind untersucht worden.

In der Tabelle ist auch der Mittelwert von den 50 normalen, mit »N« bezeichnet, und der Mittelfehler der Einzelbestimmungen aufgeführt.

Zur Berechnung sämtlicher Konstanten wurde in dieser Arbeit folgende Gleichung verwendet:

$$K \cdot t = \log \frac{C_y}{C_y - C_i}$$

wo  $t$  = der Zeit,  $C_y$  = der Konzentration des permeierenden Stoffes in der Suspensionsflüssigkeit und  $C_i$  = der Konzentration in der wässrigen Phase der Blutkörperchen ist.

Diese Gleichung wurde auch in der ersten methodischen Arbeit (ØRSKOV 1935 a) und von BANG und ØRSKOV (1937) angewandt, während MELDAHL und ØRSKOV (1940) das Volumen der wässrigen Phase der Blutkörperchen in die Gleichung eingehen liessen; da sich aber in dieser Arbeit zeigte, dass die Permeabilität der Membran sich mit grösserem Volumen der Blutkörperchen erhöht, wurde das Volumen nicht berücksichtigt. Dies bedingt keine grosse Veränderung der Konstanten, jedoch folgen für die meisten der untersuchten Stoffe die Ergebnisse hierdurch in etwas höherem Grade dem Fick'schen Gesetz.

Die angegebenen Konstanten sind Minutenkonstanten, mit deren Hilfe man die gefundenen Zeiten berechnen kann.

Auf Grund der Kontrollversuche an 3 Versuchspersonen kann man die in Abb. 1—6 angegebenen Werte für die Konstanten als Ausdruck für sehr grosse, individuelle Unterschiede in der Permeierungsgeschwindigkeit der untersuchten Stoffe ansehen.

Im Folgenden seien die Konstanten für jeden Stoff beschrieben.

### Glycerin.

Die Permeierung des Glycerins folgt dem Fick'schen Gesetz nicht.  $K_1 = 1.65$  und  $K_3 = 2.70$ , dies bedeutet, dass Glycerin

ständig schneller durch die Blutkörperchenmembran dringt; gebärende Frauen zeigen normale Permeabilität, dagegen findet sich bei ihren neugeborenen Kindern eine sehr langsame Permeierung durch die Blutkörperchenmembran. Der Unterschied ist so gross, dass es als gesichert betrachtet werden kann, er zeigt sich sowohl für  $K_1$  als auch für  $K_3$ .

#### Thioharnstoff.

Hier zeigt sich eine geringe Streuung, auch gebärende Frauen und neugeborene Kinder zeigen keine Abweichung.  $K_1$  ist im Mittel 0.29,  $K_3$  0.41; das Verhältnis zwischen den Konstanten ist also ungefähr das Gleiche wie es für Glycerin gefunden wurde.

#### Ammoniumazetat.

Bei den Versuchen an 50 normalen Personen ist  $K_1$  im Durchschnitt 0.39,  $K_3$  0.80; auch hier erfolgt die Permeierung zuerst langsam und später schneller. Da die Permeierungsgeschwindigkeit sich aber während der Versuche nach Herstellung einer neuen Ammoniumazetatlösung etwas änderte, ohne dass die Ursache hierfür gefunden werden konnte, wurde es vorgezogen die Ergebnisse nicht in Abb. 3 aufzuführen, wo sich deshalb nur die Werte für gebärende Frauen und deren neugeborene Kinder finden. Die Konstanten gebärender Frauen liegen normal; die Blutkörperchen ihrer neugeborenen Kinder geben jedoch kleine Konstanten. Dies entspricht einer Permeierung, wie dies auch bei Glycerin allerdings in weit weniger ausgesprochenem Grade gefunden wurde.

#### Hexamethylenetetramin.

Dieser Stoff zeigt eine grosse Streuung.  $K_1$  ist im Mittel 0.29,  $K_3$  0.24, beide Werte liegen relativ nahe beieinander; zuerst geht die Permeierung schnell, später langsam. Die Konstanten für gebärende Frauen und neugeborene Kinder zeigen keine besonderen Abweichungen.

#### Malonamid.

Die Streuung der Konstanten ist gross.  $K_1$  ist im Mittel 0.049,  $K_3$  0.049. Malonamid ist also von den untersuchten Substanzen der Stoff, dessen Permeierung am besten dem Fickschen Gesetz folgt, was SCHÖNHEYDER (1934) und später MELDAHL und

ØRSKOV (1940) gefunden haben. Die Permeierung durch die Blutkörperchen neugeborener Kinder erfolgt etwas langsamer als normal. Die Blutproben einiger gebärender Frauen zeigen eine besonders schnelle Permeierung für  $K_1$ .

### Glukose.

Die Konstanten zeigen grosse Streuung. In einem Fall (eine 19 jährige Frau), wo keine Symptome für eine Krankheit irgendwelcher Art vorhanden waren, zeigte  $K_1$  besonders hohe Werte d. h. — eine sehr schnelle Permeierung —. Leider war eine Wiederholung (1932) der Untersuchung unmöglich.  $K_1$  ist im Mittel 0.071,  $K_2$  0.026. Wie früher von BJERRING und von MELDAHL und ØRSKOV (1940) gezeigt wurde, erfolgt die Permeierung in dem ersten Teil weit schneller und wird dann langsamer.

Mehrere gebärende Frauen und neugeborene Kinder zeigen eine schnelle Permeierung, dies ist besonders deutlich für  $K_1$ . Es sei daran erinnert, dass eine schnelle Permeierung für Glukose von BANG und ØRSKOV (1937) bei einer Reihe von Fällen von perniziöser Anaemie gefunden wurde, und dass die Permeierung durch Behandlung mit Leber normal wurde. In 2 Fällen fand sich auch eine schnelle Permeierung bei anderen Leiden.

### Zusammenfassung.

Die Permeabilität der roten Blutkörperchen von 50 normalen Personen im Alter von 11—80 Jahren wurde untersucht. Als permeierende Stoffe wurden Glycerin, Thioharnstoff, Ammoniumazetat, Hexamethylentetramin, Malonamid und Glukose angewandt.

Es zeigte sich für dieses Material, dass Blutgruppe, Alter und Geschlecht keine Rolle für die Permeabilität zu spielen scheinen.

Wie schon früher gezeigt folgt die Permeierung dem Fick'schen Gesetz nicht streng. Malonamid und teilweise Hexamethylentetramin bilden jedoch eine Ausnahme. Glycerin, Thioharnstoff und Ammoniumazetat permeieren zuerst schnell und dann sehr langsam. Glukose permeiert zuerst schnell und später langsam.

Bezüglich der Besprechung dieses Verhaltens sei auf eine frühere Arbeit verwiesen.

Die Versuchsergebnisse sind in in Abb. 1—6 zusammengestellt, es bestehen sehr grosse individuelle Unterschiede für die Per-

meierungsgeschwindigkeiten. Dass die Unterschiede nicht durch die Methode bedingt sind, wurde dadurch gezeigt, dass von 3 Versuchspersonen eine Reihe von Blutproben über einen Monat entnommen wurden. Auch bei diesen Personen waren individuelle Unterschiede vorhanden, die während der Versuchsperiode unverändert bestehen blieben.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, wie gross die gefundenen Abweichungen von den durchschnittlichen Permeierungsgeschwindigkeiten sind. Ein Teil dieser Abweichungen wird wahrscheinlich durch physiologische Veränderungen im Blut verursacht.

Das Blut einer Reihe gebärender Frauen und neugeborener Kinder (Nabelschnurblut) wurde untersucht.

Die Blutkörperchen der gebärenden Frauen zeigten in mehreren Fällen eine besonders schnelle Permeabilität für Malonamid und Glukose.

Nabelschnurblut hat in allen Fällen eine ausserordentlich langsame Permeabilität für Glycerin, weniger deutlich war diese langsame Permeabilität für Ammoniumazetat. Die Blutkörperchen einer Reihe von neugeborenen Kindern zeigten eine schnelle Permeabilität für Glukose.

Blutproben wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. CARL TSCHERNING, Arzt an »De gamles Hjem« Aarhus, und Herrn Dr. med. AXEL OLSEN, Chefarzt der »Fødselanstalten Jylland« überlassen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des P. Carl Petersen-Fonds ausgeführt.

#### Literatur.

- BANG, O. und S. L. ØRSKOV, Hospitalstidende 1937. 80. 141.  
BANG, O., und S. L. ØRSKOV, J. clin. Invest. 1937. 16. 279.  
BJERRING, T., Studier over Glukosens Invandring i Menneskets røde Blodlegemer, Kopenhagen 1932.  
JACOBS, M. H., und S. CORSON, Biol. Bull. Wood's Hole 1934. 67. 325.  
MELDAHL, K. F., und S. L. ØRSKOV, Skand. Arch. Physiol. 1940. 83. 266.  
SCHÖNMEYDER, F., Ebenda 1934. 71. 39.  
ØRSKOV, S. L., Biochem. Z. 1934. 269. 249.  
—, Ebenda 1935. 279. 241, 250.  
—, Ebenda 1937. 290. 235.
-



## Zur Histaminbestimmung in Gewebsextrakten.<sup>1</sup>

Von

ERIC AKERBLOM.

Während der letzten Jahre sind zahlreiche Untersuchungen über das Vorkommen von Histamin in verschiedenen Organen beim Menschen und bei Versuchstieren verschiedener Art veröffentlicht worden. Die Organe variierten (Lungen, Herz- und Skelettmuskulatur, Blut, Haut u. s. w.), und bemerkenswerterweise wurden fast überall grössere oder kleinere Mengen Histamin mit Hilfe zweier Analysemethoden nachgewiesen, nämlich der Methoden von BARSOUM und GADDUM (1935) und von CODE (1937), letztere eine etwas vereinfachte Auflage der ersteren.

Das Prinzip dieser Methoden besteht in einer Fällung von Blut oder Organextrakt mit 10 proz. Trichloressigsäure, Waschung mit HCl in verschiedener Konzentration, Alkohol- oder Ätherbehandlung, Eindampfen, Verdünnung mit Wasser und Neutralisation. Kontrollen wurden zwecks Feststellung ausgeführt, wieviel Prozent zugesetzten Histamins sich als Endergebnis vorfindet. Mittels dieser Verfahren — in letzter Zeit besonders mit CODES Methode — hat man beispielsweise im Blut oder in der Haut normaler Individuen grosse Histaminmengen ermittelt. Für die Haut gibt ein Verfasser sogar bis zu 30  $\gamma$  pro Gramm an, und für Blut werden von anderen bis zu fast 2  $\gamma$  pro ml genannt. In Extrakten von Muskulatur wurden ebenfalls bemerkenswert grosse Histaminmengen angetroffen. Gewisse Verfasser haben auch von freiem und »gebundenem« Histamin gesprochen — letzteres Verhalten eine äusserst rätselhafte Erscheinung.

Wenn man wie Verfasser während eines Zeitraumes von ungefähr 10 Jahren die Wirkung des Histamins auf den Organismus

<sup>1</sup> Eingegangen am 3. Juli 1941.

studiert hat, steht man erstaunt gegenüber allen diesen Befunden. Die Möglichkeit, dass eine so hochgradig aktive Substanz im Blut beispielsweise in einer Konzentration von 2  $\gamma$  pro ml unter normalen physiologischen Verhältnissen zirkulieren könnte, muss ja in höchstem Grade Erstaunen erregen, und zwar insbesondere deswegen, weil provozierte Histaminosen — z. B. auf bakteriellem Wege — deutliche Krankheitsbilder in akuten Anfällen, in denen die Histaminkonzentration des Blutes nicht mehr als 1  $\gamma$  pro ml erreicht, zurfolge haben.

Die soeben genannten, höchst bemerkenswerten Histaminbefunde haben meine Zweifel an der Zuverlässigkeit der Analysemethoden erregt, weshalb ich Kontrollversuche mit der Ursprungssubstanz des Histamins, dem *Histidin*, angestellt habe. Diese Aminosäure ist bekanntlich einer der wichtigeren Bausteine im Eiweissmolekül und kommt in ziemlich grossem Umfange in sämtlichen Organen vor. Während des Transportes vom Darm auf dem Wege der Blutbahn zu den verschiedenen Zellgebieten findet sich dieselbe ja in leichtlöslicher Form vor. Dasselbe dürfte wenigstens in gewissem Umfange in den Interzellularräumen der Fall sein.

Wir wissen, dass das Histidin unter anderem auf physikalischem, bakteriellem und fermentativem Wege zu dem Histamin decarboxyliert werden kann, und ich möchte hinzufügen, dass dieses auffällig leicht geschehen kann.

Geht man nun von einer Histidinlösung, beispielsweise 10 mg in 10 ml Wasser, aus und benutzt man die obengenannten Analysemethoden, so erhält man ziemlich grosse Quantitäten Histamin. Die Ausbeute kann etwas variieren, hält sich aber auf wenigstens 1  $\gamma$  pro ml. Bei näherer Untersuchung findet man, dass die Trichloressigsäure in gewissem Umfange das Histidin decarboxyliert.

Wird die Analyse (BARSOUM-GADDUM oder CODE) mit 10 ml Pferdeblut, das mit 10 mg Histidin versetzt wurde, ausgeführt, so erhält man eine sehr kräftige Histaminreaktion, welche grösser ist als bei einer Analyse allein mit einer aus 10 mg Histidin + 10 ml Wasser bereiteten Lösung, selbst wenn z. B. mit der Methode von CODE in dem gleichen Blut ohne Histidinzusatz kein Histamin nachgewiesen wurde.

Einige Versuche wurden mit Haut- und Muskelextrakt von einem Meerschweinchen ausgeführt, und zwar teils mittels Titrierung direkt am atropinisierten Darm und teils durch Analyse nach

CODE. Im ersteren Falle erhielt ich mit der Haut eine Histaminreaktion, die ungefähr 0.1  $\gamma$  pro ml entsprach, mit der Muskulatur ein völlig negatives Resultat. Die CODE-Analyse ergab mit der Haut zwischen 0.8 und 1  $\gamma$  Histamin und mit der Muskulatur ungefähr 0.2  $\gamma$  Histamin pro ml. Die Annahme liegt sehr nahe, dass die Zunahme der Histaminreaktion am Darm nach der CODE-Analyse durch Gewebehistidin verursacht wurde, das an der Eiweissynthese noch nicht teilgenommen hatte; dieses ist jedenfalls viel wahrscheinlicher als dass die Steigerung durch Histamin bedingt wurde, das auf irgendeine Weise »frei wurde«. Ich möchte betonen, dass das sehr leicht lösliche Histamin, wenn es im Organismus vorkommt, direkt im Blut oder in einem Organextrakt erfassbar ist.

Ich möchte schliesslich hervorheben, dass das im Organismus in gelöster Form vorkommende Histidin äusserst leicht zu Histamin aus verschiedenen Gründen decarboxyliert wird, auf die ich später zurückzukommen beabsichtige.

### Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, dass die Methoden von BARSOUM-GADDUM und von CODE zum Nachweis von Histamin in Gewebsextrakten nicht zuverlässig sind, weil Histidin dabei decarboxyliert werden kann.

### Literatur.

BARSOUM, G. S., and J. H. GADDUM, *J. Physiol.* 1935. 85. 1.  
CODE, C. F., *J. Physiol.* 1937. 89. 257.

---

# ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. II. SUPPLEMENTUM III.

---

Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Helsinki  
(Vorstand: P. E. SIMOLA)

## TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSSCHIEDUNG DER BRENZTRAUBENSÄURE, $\alpha$ -KETOGLUTARSÄURE UND CITRONENSÄURE SOWIE EINIGER ANDERER MIT DEREN UMSATZ NAHE VERKNÜPFTER VERBINDUNGEN IM HARN

VON

*FRANZ-EDUARD KRUSIUS*

HELSINKI 1940



## INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
<i>Vorwort</i> .....	5
<i>Einleitung</i> .....	7
I. <i>Frühere Forschungen</i> .....	9
1. Allgemeines über den intermediären Umsatz der Brenztraubensäure, $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Citronensäure ....	9
2. Über die Ausscheidung der Brenztraubensäure, Milchsäure, $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Citronensäure sowie der Acetonkörper mit dem Harn .....	17
3. Über frühere Belastungsversuche .....	24
II. <i>Chemische Methodik</i> .....	33
1. Bestimmungsmethoden der Gesamt- $\alpha$ -Ketosäuren.....	33
2. Bestimmung der $\alpha$ -Ketoglutarsäure .....	42
3. Bestimmung der Brenztraubensäure .....	51
4. Bestimmung der Milchsäure .....	59
5. Bestimmung der Citronensäure .....	62
6. Bestimmung der Acetonkörper .....	64
III. <i>Experimentelle Untersuchungen bei Ratten über die Ausscheidung der Brenztraubensäure, Milchsäure, <math>\alpha</math>-Ketoglutarsäure und Citronensäure sowie der Acetonkörper</i> .....	68
1. Die Wirkung verschiedener Nahrungsgemische .....	68
2. Der Einfluss des Hungers .....	82
3. Der Einfluss der Verabreichung reichlicher Alkalimengen ..	87
4. Belastungsversuche mit den neutralen Natriumsalzen verschiedener organischer Säuren .....	94
5. Belastungsversuche mit freien oder nur teilweise neutralisierten organischen Säuren .....	130

	Seite
IV. <i>Komplementierende experimentelle Untersuchungen bei Meer-</i> <i>schweinchen und Kaninchen</i> .....	138
V. <i>Besprechung der Ergebnisse</i> .....	146
VI. <i>Zusammenfassung</i> .....	153
VII. <i>Literaturverzeichnis</i> .....	156

## VORWORT.

Diese Arbeit wurde um die Jahreswende 1936—37 auf Anregung meines verehrten Chefs, Professor Dr. med. et phil. P. E. SIMOLA im Medizinisch-chemischen Universitätslaboratorium begonnen. Obgleich die Abhandlung schon im Herbst 1939 im Manuskript fertig war, konnte sie wegen der aussergewöhnlichen Verhältnisse in Folge des finnisch-russischen Krieges bisher nicht gedruckt werden. Es ist daher auch die einschlägige Fachliteratur nur bis September 1939 berücksichtigt worden.

An dieser Stelle ist es mir ein aufrichtiges Bedürfnis Prof. P. E. SIMOLA meinen ergebensten und innigsten Dank auszusprechen für die Überlassung dieses Themas wie auch für seine nimmer ermüdende Beratung und Unterstützung bei der Gestaltung der Untersuchungen und der Verwertung der Ergebnisse. Nur weil es mir gestattet war, diese langwierigen und kostspieligen Untersuchungen im Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Helsinki auszuführen und mir die notwendigen Apparaturen und das Tiermaterial einschränkungslos zur Verfügung gestellt wurden, war die Durchführung dieser Arbeit möglich.

Ferner sage ich Cand. med. TERTTU O. KOSUNEN warmen Dank. Sie half mir in aufopferungsvollster Weise bei der Durchführung vieler Bestimmungen und stellte mir sogar einige eigene Resultate zur Verfügung.

Schliesslich möchte ich an dieser Stelle noch der Universität Helsinki vielmals für die Verleihung eines Stipendiums für junge Wissenschaftler danken, wodurch die Ausführung dieser Untersuchungen sehr erleichtert wurde.

Helsinki, im Mai 1940.

FRANZ-EDUARD KRUSIUS.





## EINLEITUNG.

Die vorliegende Arbeit bildet ein Glied einer umfangreicheren Arbeitsserie von SIMOLA, die 1935 zur näheren Erforschung des  $\alpha$ -Ketosaurestoffwechsels begonnen wurde. Unter diesen Verbindungen ist die Brenztraubensäure schon seit langer Zeit als eines der wichtigsten Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels angesehen worden, obschon unsere Kenntnisse von dem Vorkommen dieser Säure im Tierorganismus, wie auch von den genaueren Umsatzvorgängen derselben, immer noch völlig unzureichend sind und weiterer Klärung bedürfen. Die  $\alpha$ -Ketoglutar-säure ist dagegen erst in den letzten Jahren mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. 1936 gelang es SIMOLA diese Säure als tierisches Stoffwechselprodukt nachzuweisen, in dem er aus dem Harn von Ratten bei B-Vitaminmangelzuständen — vor allem bei B<sub>1</sub>-Karenz — wie auch nach Belastung mit Brenztraubensäure grosse Mengen  $\alpha$ -Ketoglutar-säure isolieren konnte. Dieser Befund gab dann den näheren Anlass zu den vorliegenden Untersuchungen.

Ursprünglich war es meine Absicht in dieser Arbeit an Hand von experimentellen in-vivo-Versuchen Aufklärung über den Umsatz der Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketoglutar-säure im tierischen Stoffwechsel zu suchen. Hierbei sollte vor allem durch Verfolgung der Ausscheidung dieser  $\alpha$ -Ketosauren und durch Prüfung der Faktoren, von denen unter gewissen Umständen eine Beeinflussung derselben erwartet werden konnte, weiterer Aufschluss über die Stoffwechselvorgänge gewonnen werden, an denen diese Verbindungen beteiligt sind. Ferner beabsichtigte ich durch Fortsetzung der von SIMOLA eingeleiteten Belastungsversuche mit verschiedenen, bei Untersuchungen über die Bildung der  $\alpha$ -Keto-säuren besonders intressanten Verbindungen, zu weiteren experimentellen Stützen über den näheren Mechanismus des Zwischenstoffwechsels der Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketoglutar-säure im tierischen Organismus zu gelangen.

Um die Ausscheidung dieser beiden Säuren mit dem Harn verfolgen zu können, ergab sich als erste Aufgabe die Ausarbeitung bzw. Modifizierung brauchbarer chemischer Verfahren zur genauen und insbesondere spezifischen Bestimmung dieser Verbindungen. Diese methodischen Vorarbeiten bilden einen wichtigen Teil der vorliegenden Untersuchung.

Einerseits war schon von vornherein klar, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Brenztraubensäure und der Milchsäure besteht, nicht nur in biologischer, sondern auch in chemischer Beziehung. Da die genaue Bestimmung der Brenztraubensäure eine gleichzeitige Bestimmung der Milchsäure voraussetzt, ergab es sich ohne weiteres, dass die Ausscheidung beider Säuren untersucht wurde.

Andererseits ergaben die Befunde von SIMOLA und seinen Mitarbeitern über die Rolle der Brenztraubensäure bei der enzymatischen Citronensäurebildung *in-vitro* in tierischen Geweben, sowie die wichtige Feststellung von KNOOP und MARTIUS, dass die Citronensäure über  $\alpha$ -Ketoglutarsäure abgebaut wird, dass die Citronensäure wegen ihrer nahen Beziehungen zu den  $\alpha$ -Ketosäuren auch berücksichtigt werden musste.

Endlich gab der schon seit langem bekannte Umstand, dass auch zwischen der Brenztraubensäure und den Acetonkörpern gewisse Zusammenhänge bestehen, obgleich diese immer noch nicht eindeutig geklärt sind, Anlass in dieser Arbeit auch die Ausscheidung der Acetonkörper zu berücksichtigen.

Durch Hinzufügen dieser mit den  $\alpha$ -Ketosäuren biologisch in enger Beziehung stehenden Produkte des Zwischenstoffwechsels wurde das ursprüngliche Arbeitsprogramm stark erweitert. Eine Folge hiervon war, dass der Umfang der Arbeit, trotz starker Kürzung,<sup>1</sup> viel grösser als ursprünglich beabsichtigt wurde. Jedoch scheint es mir, dass die erhaltenen Ergebnisse durch die Erweiterung des Themas an Klarheit gewonnen haben und infolgedessen sicherere Schlussfolgerungen zulassen.

---

<sup>1</sup> U. a. wurde in dieser Arbeit der Einfluss der verschiedenen B-Avitaminosen auf die Ausscheidung der  $\alpha$ -Ketosäuren nicht behandelt; hierüber soll später an andere Stelle eingehend berichtet werden.

# I. Frühere Forschungen.

## 1. Allgemeines über den intermediären Umsatz der Brenztraubensäure, $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Citronensäure.

### *Brenztraubensäure (BTS).*

Schon seit langer Zeit ist die Bildung von Brenztraubensäure (BTS) wie auch von Milchsäure (MS) bei dem Kohlenhydratabbau eine allgemein anerkannte und festfundierte Tatsache. Nach der heute am meisten vertretenen Ansicht wird bei der Glycolyse über Triosephosphorsäure BTS gebildet und dieselbe dann durch Dismutation mit einer Triosephosphorsäure zu MS umgesetzt. Hier braucht auf diese allgemein bekannten Reaktionsvorgänge nicht näher eingegangen zu werden.

Andererseits fungieren aber auch die BTS und MS im Stoffwechsel als Glycogenbildner, indem aus beiden unter Aufwand von Oxydationsenergie Kohlenhydrat resynthetisiert wird. Die zu diesem Vorgange notwendige Energie wird nach den Worten von MEYERHOFF »durch Verbrennung eines dem Sauerstoffverbrauch entsprechenden Kohlenhydrat-äquivalents« geliefert. Welche Verbindung hierbei oxydiert wird, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden, gewisse Tatsachen deuten aber daraufhin, dass die BTS für die Lieferung der Verbrennungsenergie in Frage kommen kann.

Wie schon erwähnt, ist man heute ziemlich allgemein der Ansicht, dass die MS hauptsächlich aus BTS gebildet wird. Andererseits ist aber auch schon lange bekannt, dass die MS leicht zu BTS dehydriert werden kann; hierauf deutet vor allem auch das reichliche Vorkommen der Milchsäuredehydrase neben anderen Dehydrasen im tierischen Organismus.

Der weitere Abbau der BTS bzw. MS ist bis heute noch nicht mit Sicherheit geklärt. Erschwerend wirkt, dass dieser Abbau nicht nur bei Bakterien, Schimmelpilzen, Hefe und im Tierkörper teils verschieden vorsichzugehen scheint, sondern dass sich auch die einzelnen tierischen Gewebe offenbar verschieden verhalten. Während des Verlaufs dieser Untersuchungen ist die Erforschung des Abbaus bzw. Umsatzes der  $\alpha$ -Ketosäuren und insbesondere der BTS noch aktueller geworden. Seit dem Jahre 1937 sind aus vielen Laboratorien Arbeiten erschienen, in denen der

BTS-Umsatz der Mikroorganismen und des Tierkörpers durch viele interessante und wichtige Versuchsergebnisse in neues Licht gestellt wird; ebenso sind über den Reaktionsmechanismus viele neue Theorien und Hypothesen aufgestellt worden. Im Folgenden sollen kurz die wichtigsten Befunde über den BTS-Umsatz im tierischen Organismus, die auf den Ergebnissen von in-vitro-Versuchen basieren, erläutert werden.

Einen besonderen Antrieb hat die  $\alpha$ -Ketosäurenforschung in den letzten Jahren durch eine Reihe von Befunden über die B-Vitamingruppe bekommen. AUBAGEN stellte 1931 fest, dass zur Kohlensäureabspaltung aus BTS neben der Carboxylase ein Aktivator, die s. g. Cocarboxylase nötig ist, die auch im Tierkörper vorkommt. Im Anschluss an diesen Befund richtete SIMOLA (1932) seine Aufmerksamkeit auf den niedrigen Cocarboxylasegehalt der Gewebe bei Mangel von verschiedenen B-Vitaminfaktoren und zeigte gleichzeitig, dass die Cocarboxylase in hochgereinigter Form einen Einfluss auf die B-avitaminotischen Ratten ausübt. In Übereinstimmung mit dem Gedanken, dass die B-Vitamingruppe in enger Beziehung zu dem Stoffwechsel der  $\alpha$ -Ketosäuren, vor allem der BTS steht, gelang es ihm durch Untersuchungen, die in den Jahren 1934—36 vorgenommen wurden (SIMOLA, 1936 (1), 1936 (2) und 1939), eine Anhäufung von  $\alpha$ -Ketosäuren im Harn und Blut bei B-Vitaminmangelzuständen, vor allem  $B_1$ -Karenz, nachzuweisen. Andererseits wurde von LOHMANN und SCHUSTER (1937) festgestellt, dass die Cocarboxylase tatsächlich phosphoryliertes  $B_1$ -Vitamin ist. Schon etwas früher war PETERS (1936) auf Grund von in-vitro-Versuchen mit Gehirngewebe zu der Auffassung gekommen, dass das  $B_1$ -Vitamin irgendwie in direkter Beziehung zu dem oxydativen Abbau der BTS steht. Von anderen Untersuchungen über die Beziehungen des BTS-Umsatzes zum  $B_1$ -Vitamin sei erwähnt, dass im Laboratorium von PETERS zuerst die Ansicht verfochten wurde, dass das freie, nicht mit Phosphorsäure veresterte Vitamin viel effektiver sei bei der Oxydation der BTS als die Cocarboxylase (PETERS, 1937). Jedoch die neusten, eingehenderen Forschungen von BANGA, ОЧОА und PETERS (1939) haben zum entgegengesetzten Ergebnis geführt, indem endgültig festgestellt wurde, dass das  $B_1$ -Vitamin bei der Aktivierung der BTS-Verbrennung doch in phosphorylierter Form vorliegt, wie dies ja auch bei der Decarboxylation der Hefegärung der Fall ist.

Was den Umsatzmechanismus selbst anbetrifft, ist man im Gegensatz zu der alten, von NEUBERG verfochtenen Schulauffassung, nach welcher die BTS durch eine gleichartige Kohlendioxydabspaltung wie in Hefe zu Acetaldehyd abgebaut wird, in letzter Zeit mehr und mehr geneigt gewesen, die Bildung von Acetaldehyd als Zwischenprodukt völlig zu verneinen. Zwar wird aus BTS unter anaeroben Bedingungen in verschiedenen tierischen Geweben regelmässig Kohlendioxyd gebildet (vgl. u. a. KREBS und JOHNSON, 1937 und SIMOLA und PUUTULA, 1937), aber dies beruht nach den zuerst genannten Autoren auf der Dismutation zweier Moleküle BTS ohne vorhergehende Acetaldehydbildung, wobei das eine Molekül zu Essigsäure und Kohlensäure oxydiert, während das andere zu

MS reduziert wird. Zu ähnlichen Ergebnissen über den anaeroben Abbau der BTS sind auch LIPMANN (1937) und WEIL-MALHERBE (1937) gelangt. Auch bei dem aeroben Umsatz der BTS soll nach KREBS und JOHNSON (1937), wenigstens in Testis und Gehirn derselbe Prozess vorsichgehen. Nach der Ansicht von LIPMANN (1937) kann im Gehirn ausser der Dismutation der BTS auch eine einfache Dehydrierung stattfinden, wobei die BTS direkt zu Essigsäure und Kohlendioxyd oxydiert würde. Nach den Befunden dieses Forschers soll die BTS unter anaeroben Bedingungen bei Gegenwart von Methylenblau im ausgewaschenen Gehirngewebe quantitativ zu Essigsäure und Kohlendioxyd gespalten werden. — Eine Dehydrierung der BTS zu Essigsäure und Kohlensäure war bekanntlich auch schon früher von DAVIS (1933) und BARRON (1936) bei gewissen Bakterienarten nachgewiesen worden.

Der aerobe Abbau der BTS ist vor allem durch die Untersuchungen von PETERS und seinen Mitarbeitern erforscht worden. Nach diesen Arbeiten verbrennt der grösste Teil der BTS unter Mitwirkung des die BTS oxydierenden Enzymsystems zu Kohlendioxyd und Wasser, wobei ferner als Reaktionsprodukte beachtenswerte Mengen Essigsäure und etwas MS gebildet werden (Mc GOWAN und PETERS, 1937; LONG, 1938; LONG und PETERS, 1939; BARRON und LYMAN, 1939). Über den genaueren Reaktionsmechanismus bei der oxydativen BTS-Spaltung geben diese Untersuchungen aber keinen Aufschluss.

Als einen möglichen Weg bei dem Abbau der BTS ist schon wiederholt der Reaktionsverlauf über Dicarbonsäuren in Erwägung gezogen worden. So dachten TOENNIESSEN und BRINKMANN (1930) als erste an die Kondensation von zwei Molekülen BTS, wobei zuerst Diketoadipinsäure — ein hypothetisches Polymerisationsprodukt — entstände und dann unter Abspaltung von zwei Molekülen Ameisensäure Bernsteinsäure. In letzter Zeit ist WEIL-MALHERBE (1937) zu der Auffassung gekommen, dass die BTS erst zu Essigsäure decarboxyliert werde und dass anschliessend zwei Moleküle Essigsäure in statu nascendi zu Bernsteinsäure umgesetzt würden. Nach einer ungefähr gleichzeitig von KREBS und JOHNSON (1937) vertretenen Ansicht soll sich die durch Decarboxylierung der BTS gebildete Essigsäure mit BTS zu  $\alpha$ -Ketoglutaräure (KGS) verbinden.

In Bezug auf Faktoren, die bei dem Umsatz der BTS mitwirken, ist noch die bekannte, von SZENT-GYÖRGYI (1936—37) ausgearbeitete Theorie zu erwähnen, nach der die  $C_4$ -Dicarbonsäuren die Dehydrierungsprozesse im Tierkörper, u. a. auch die Oxydation der BTS, katalytisch fördern. Durch die erwähnten Untersuchungen von BANGA, OCHOA und PETERS (1939) über den BTS-Umsatz fand diese Theorie erneute Bestätigung. Im Zusammenhang hiermit ist auch der Nachweis von ANNAU und ERDÖS (1939) von Interesse, dass minimale Mengen Bernsteinsäure in-vitro in Gegenwart von Methylenblau als Aktivator der BTS-Oxydation fungieren; diesen Aktivator konnten sie auch aus tierischem Gewebe isolieren und als Bernsteinsäure identifizieren.

Als eine weitere Umsatzmöglichkeit hat man auch den Übergang der

BTS in Acetonkörper (*AK*) angesehen. Nachdem schon 1911 von EMBDEN und OPPENHEIMER gezeigt worden war, dass bei Durchblutung der Leber mit BTS *AK* gebildet werden können, ist auch in neuerer Zeit vielerseits eine Entstehung von Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure (*OBS*) bei Bebrütung verschiedener Gewebe mit BTS festgestellt worden: In Leber von GORR (1932), ANNAU (1934), EDSON (1935) und KREBS und JOHNSON (1937); im Gehirn von WEIL-MALHERBE (1936); im Muskel von ANNAU (1935) und KREBS und JOHNSON (1937); und schliesslich auch in Herz, Niere und Testis von KREBS und JOHNSON (1937). — ANNAU, welcher die fördernde Wirkung des Ammoniaks auf die *AK*-Bildung beobachtete, erwog die Möglichkeit, dass die *AK* über die Parabrenztraubensäure als Zwischenprodukt entstünden.<sup>1</sup> Nach KREBS und JOHNSON (1937) soll die durch Kohlendioxydabspaltung gebildete Essigsäure mit BTS zu Acetbrenztraubensäure kondensiert werden, welche dann leicht zu  $\beta$ -Oxybuttersäure (*OBS*) umgesetzt würde.

Auch der Übergang von BTS in Alanin ist eine schon lange experimentell erwiesene Tatsache. Besonderes Interesse hat diese Frage in letzter Zeit durch den Befund von BRAUNSTEIN und KRITZMANN (1937) bekommen, nach welchem in tierischen Geweben ein spezifisches Enzymsystem vorhanden ist, das durch Umaminierung aus Glutaminsäure (oder einer anderen Aminosäure) die Aminogruppe an die BTS abgeben kann, wobei als Reaktionsprodukte KGS (oder eine andere der umgesetzten Aminosäure entsprechende  $\alpha$ -Ketosäure) und Alanin entstehen. —

Wie aus dieser kurzen Zusammenfassung hervorgeht sind Dank den Forschungen der letzten Jahre viele Fragen über den Umsatz der BTS geklärt worden. Andererseits habe ich aber auch versucht zu betonen, dass für viele wichtige Vorgänge noch keine allgemein anerkannte Erklärung vorhanden ist und dass die Probleme des Umsatzes der BTS in ihrer Gesamtheit noch weiterer Klärung durch zahlreiche und verschiedenartige experimentelle Arbeiten bedürfen.

### *$\alpha$ -Ketoglutarsäure (KGS).*

Unsere Kenntnisse über die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (*KGS*) als intermediäres Stoffwechselprodukt und ihre Beziehungen zum Kohlenhydrat- und Eiweissumsatz sind erst ein Ergebnis der Forschungen der allerletzten Jahre. Bekanntlich ist die *KGS* eine  $\alpha$ -Ketodicarbonsäure, bestehend aus einer 5-C-atomigen, unverzweigten Kette ( $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-COOH}$ ). Die entsprechende  $\alpha$ -Aminosäure, die Glutaminsäure ist schon seit langem als wichtiger Eiweissbaustoff bekannt. Gemäss den bereits erwähnten klassischen Untersuchungen von NEUBAUER und KNOOP über die oxydative Desaminierung von  $\alpha$ -Aminosäuren zu den entsprechenden Keto-

<sup>1</sup> Die Kondensation von brenztraubensauren Salzen in reinen, wässrigen Lösungen zu Parabrenztraubensäure oder BTS-Aldol wurde bereits von WOLFF (1898—1901) und DE JONG (1901—1904) beschrieben. NEUBERG und ARINSTEIN (1921) konstatierten ferner, dass diese Verbindung von Hefe und von Buttersäurebacillen vergoren wird.

säuren, war theoretisch die Bildung von KGS im tierischen Organismus schon früher diskutiert worden (KNOOP, 1931). Im Jahre 1912 zeigten NEUBERG und KERB, dass synthetische KGS der zuckerfreien Gärung fähig ist und einige Jahre später NEUBERG und RINGER (1915), dass aus KGS im zellfreien Hefemazerationssaft durch Wirkung der Carboxylase Bernsteinsäure entsteht, ohne dass die Hefe Zucker vergärt.

Im Jahre 1933 konnte KREBS durch Vergiftung des Nierengewebes mit Arsenigsäure Glutaminsäure zu KGS umsetzen, die er als 2,4-Dinitrophenylhydrazon isolierte; ebenso erhielt er aus Asparaginsäure Oxalessigsäure. Auch aus Prolin wurde KGS und  $\text{NH}_3$  erhalten im vergifteten Nierengewebe (WEIL-MALHERBE und KREBS, 1935). In den Jahren 1934—36 fand SIMOLA bei eingehender Untersuchung der Stoffwechselstörungen bei verschiedenen B-avitaminotischen Zuständen eine starke Anhäufung von Carbonylverbindungen im Blute. Vor allem aber konnte er feststellen, dass die B-avitaminotischen Ratten mit dem Harn bedeutende Mengen einer Carbonylverbindung ausschieden, die sich als 2,4-Dinitrophenylhydrazinverbindung ausfällen und isolieren liess. Die nähere chemische Untersuchung und vor allem die Mikroelementaranalyse ergaben dann, dass es sich um das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der KGS handelte. Hiermit war der Nachweis erbracht, dass die KGS ein intermediäres Stoffwechselprodukt des tierischen Organismus ist und kein Kunstprodukt biochemischer Experimente. 1937 konnte SIMOLA ferner an Hand von Belastungsversuchen bei Ratten mitteilen, dass die Verabreichung von BTS zur Ausscheidung grosser Quantitäten von KGS führte. Später wurde das selbe Ergebnis bei Belastung von Menschen mit BTS erhalten (SIMOLA und KRUSIUS, 1939).

Heute ist das Schrifttum über die KGS schon ziemlich umfangreich. Durch die Untersuchungen von KNOOP und MARTIUS (1935, 1938) und MARTIUS (1937—1938) wurde nachgewiesen, dass die KGS aus Citronensäure (CS) entstehen kann und dass dies wohl der Hauptabbauweg der CS ist. Aus CS wird über Aconitsäure iso-Citronensäure gebildet, wozu eine in allen Geweben anzutreffende Hydratase, die Aconitase nötig ist. Die iso-Citronensäure wird dann durch Wirkung einer iso-Citricodehydrogenase (identisch mit der Citrico-Dehydrase von THUNBERG, 1929) über  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -carboxyglutarsäure zu KGS dehydriert.

Als zweite Bildungsmöglichkeit der KGS im tierischen Organismus ist die Desaminierung der Glutaminsäure anzusehen. Diese Reaktion ist durch die angeführten Versuche von KREBS (1933) erwiesen. WEIL-MALHERBE (1936) zeigte, dass die Glutaminsäure als einzige Aminosäure im Gehirn oxydativ desaminiert wird und dass hierbei KGS entsteht. Andererseits beobachtete dieser Autor auch, dass KGS in Gehirnschnitten in Gegenwart von BTS oder Glucose Ammoniak bindet, wodurch die Umkehrbarkeit der Glutaminsäure-desaminierung erwiesen schien.

Vor allem aber haben die Untersuchungen von BRAUNSTEIN und KRITZMANN (1937) gezeigt, dass in vielen tierischen Geweben eine Umaminierung zwischen Glutaminsäure und  $\alpha$ -Ketosäuren, vor allem der BTS statt-



findet, wobei KGS und eine  $\alpha$ -Aminosäure (aus BTS d-Alanin) entsteht. Nach Befunden von SIMOLA und ALAPEUSO (1939) ist es sehr wahrscheinlich geworden, dass in-vitro wenigstens ein Teil der KGS, die nach Zusatz von BTS zu Gehirnbrei entsteht, aus Glutaminsäure gebildet wird. Es wurde nämlich festgestellt, dass im Gehirn recht bedeutende Mengen freier Glutaminsäure vorkommen. v. EULER, ADLER, GÜNTHER und DAS (1938) haben in der Leber und Niere eine spezifische Apodehydrase der Glutaminsäure gefunden und isoliert, welche diese Aminosäure zu Iminoglutar-säure in Gegenwart von Cozymase (Codehydrogenase I) oder Codehydrogenase II dehydriert. Die Iminoglutar-säure zerfällt dann spontan durch Hydrolyse in KGS. Diese Reaktion ist reversibel und geht auch in Abwesenheit von  $\text{NH}_3$ -Acceptoren vor sich.

Über den weiteren Abbau der KGS steht fest, dass er wenigstens teilweise über Bernsteinsäure erfolgt, wie es für Hefe zum ersten Mal von NEUBERG und RINGER (1915) gezeigt wurde. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird die KGS zu Bernsteinsäure decarboxyliert, die dann weiter zu Fumarsäure dehydriert wird, von wo der Abbau über Äpfelsäure zu Oxalessigsäure führt. Aus Oxalessigsäure kann dann durch Abspaltung von Kohlendioxyd BTS entstehen, die weiter zu Essigsäure oxydiert würde. Beim Citratabbau entstehen aber aus einem Molekül CS zwei Moleküle Essigsäure, wie verschiedene Forscher zeigen konnten, während es nach diesem Schema nur zur Bildung von einem Molekül Essigsäure käme. Um von einem Molekül KGS zu zwei Molekülen Essigsäure zu kommen hat MARTIUS (1938) an die Bildung von  $\beta$ -Oxyglutar-säure aus KGS gedacht, deren weiterer Abbau zur Bildung von Aceton oder zwei Molekülen Essigsäure führen würde. Als Zwischenprodukt bei dieser Reaktion entstünde  $\alpha$ -Oxyglutar-säure, aus der dann Glutaconsäure gebildet würde. An diese lässt sich nach DAKIN leicht Wasser anlagern unter Bildung der  $\beta$ -Oxyglutar-säure. Bisher ist aber die Wasserabspaltung aus  $\alpha$ -Oxyglutar-säure nicht im tierischen Organismus nachgewiesen worden, während die Reduktion der KGS zu  $\alpha$ -Oxyglutar-säure sowohl von WEIL-MALHERBE (1937) als auch von GREEN (1937) beobachtet wurde. — Zu erwähnen wäre ferner noch, dass nach WEIL-MALHERBE (1937) die Bernsteinsäurebildung unter anaeroben Bedingungen aus KGS nicht durch Decarboxylierung, sondern durch Dismutation zweier Moleküle KGS zu einem Molekül  $\alpha$ -Oxyglutar-säure, einem Molekül Bernsteinsäure und Kohlendioxyd zu erklären ist.

### *Citronensäure (CS).*

Das Vorkommen von Citronensäure (CS) in tierischen Produkten steht schon ziemlich lange fest, trotzdem war aber bis vor kurzem kaum etwas über die Bedeutung dieser Säure im Stoffwechsel bekannt. Nachdem THUNBERG (1929) im Gurkensamen eine spezifische Dehydrase der CS entdeckt und hiervon ausgehend eine genaue biologische Bestimmungsmethode ausgearbeitet hatte, wurde von ihm und seiner Schule das mengenmässige Vorkommen der CS in verschiedenen tierischen Organen und Produkten exakt untersucht. In den folgenden Jahren wurde dann von

mehreren Forschern der endgültige Nachweis der endogenen CS-Bildung erbracht. Untersuchungen über die Bedeutung der CS als normales intermediäres Stoffwechselprodukt des menschlichen und tierischen Körpers sind aber eigentlich erst in den aller letzten Jahren vorgenommen worden.

Auf Grund zahlreicher experimenteller Forschungen ist man heute ziemlich allgemein der Ansicht, dass die CS hauptsächlich als Zwischenprodukt des Kohlenhydratumsatzes anzusehen ist.<sup>1</sup> Über ihre Bildung ist noch nichts Abschliessendes zu sagen. Im Zusammenhang mit systematischen Untersuchungen, die seit 1937 in diesem Laboratorium in Gang gewesen sind, beobachtete SIMOLA (1937), dass die CS-Ausscheidung bei Ratten nach Verabreichung von BTS stark zunimmt; in den folgenden Jahren konstatierten SIMOLA und Mitarbeiter (1938—39) bei in-vitro-Versuchen mit BTS einen gleichartigen Effekt. Ausser der BTS hatten in diesen Versuchen aber auch die  $C_2$ -Dicarbonsäuren und die OBS und KGS starken Einfluss auf die CS-Bildung. SIMOLA, HALLMAN und ALAPEUSO (1939) zeigten dann, dass durch Kombination von BTS mit Fumarsäure oder Oxalessigsäure eine stärkere Wirkung zu erzielen ist als bei in-vitro-Versuchen mit jeder Säure allein. Am deutlichsten und stärksten kommt dieser Kombinationseffekt zum Vorschein bei Bebrütung von Herzmuskelgewebe (HALLMAN, 1939; HALLMAN und SIMOLA, 1939).<sup>2</sup> Es mag noch erwähnt werden, dass MÄRTENSSON (1938, 1939) im Gegensatz zu diesen Befunden auf Grund seiner Perfusionsversuche mit Leber und Nieren und seinen CS-Bestimmungen im arteriellen und venösen Renalblut nach Belastung mit Äpfelsäure die Ansicht vertritt, dass die CS-Bildung nur eine scheinbare sei und vorgetäuscht werde durch Vergiftung des die CS abbauenden Enzymsystems.

Über die Bildung der CS sind im Laufe der Zeit zahlreiche Theorien aufgestellt worden. Da alle diese Theorien auf Versuche mit Schimmelpilzen basieren und auch grössten Teils veraltet sind, können sie hier übergangen werden. FÜRTH, MINIBECK und EDEL (1934) vertraten die Ansicht, dass die CS im tierischen Organismus aus Essigsäure gebildet würde. KREBS (1938) hat an die Kondensation von Oxalessigsäure mit Triose gedacht. Auf Grund seiner Versuche über die CS-Bildung vertritt SIMOLA (1938, 1939) den Standpunkt, dass die CS aus BTS und Oxalessigsäure entsteht, wofür ja vor allem auch die Synthese von KNOOP und MARTIUS (1936) auf rein chemischem Wege spricht. — Anfangs hatte SIMOLA (1938) auch die Möglichkeit der Vereinigung zweier Moleküle Oxalessigsäure zu einer Tetracarbonsäure mit nachfolgender Kohlensäureabspaltung und Oxydation zu CS in Erwägung gezogen.

Der Abbau der CS im Tierkörper ist dagegen sicherer bekannt. THUNBERG (1929) vertrat ursprünglich die Ansicht, dass die CS über eine ortho-saure Form von der Dehydrogenase unter Abspaltung von Kohlensäure

<sup>1</sup> Diese Ansicht basierte ursprünglich auf Untersuchungen bei verschiedenen Pilzarten (vgl. z. B. BERNHAUER: »Die oxydativen Gärungen«, 1932).

<sup>2</sup> Von HALLMAN erscheint demnächst in dieser Zeitschrift eine Dissertation über die CS-Bildung in tierischen Geweben.

zu Acetondicarbonensäure dehydriert würde. Nach anderen älteren Forschungen sollte primär von der CS Ameisensäure abgespalten werden, wobei ebenfalls Acetondicarbonensäure entstände. Da die Acetondicarbonensäure leicht durch Decarboxylierung in Acetessigsäure übergeht, glaubte man die CS zu den AK-Bildnern rechnen zu müssen. Heute ist die Acetondicarbonensäuretheorie, wenigstens was den Abbau bei höheren Tieren betrifft, als falsch verlassen, da viele Forscher bei der Dehydrierung der CS keine Acetondicarbonensäure- bzw. Acetonbildung feststellen konnten. (Bei Leberversuchen LANGECKER, 1934; WAGNER-JAUREGG und RAUEN, 1935; bei Hefe WIELAND und SONDERHOFF 1932—33; MÜLLER, 1935; bei Bakterien WIELAND und SONDERHOFF, 1932—33). Auch gelang es WAGNER-JAUREGG und RAUEN (1935) zu zeigen, dass weder Acetondicarbonensäure noch Ameisensäure auch nur annähernd die CS als Wasserstoffdonatoren im Thunbergversuch ersetzen können; von eventuellen Zwischenprodukten des CS-Abbaus muss jedoch erwartet werden, dass sie wenigstens ebenso schnell dehydriert werden. Schliesslich konstatierte MARTIUS (1937), dass die in früheren Versuchen bedingte Zunahme einer Bisulfit-bindenden Substanz nicht durch Acetondicarbonensäure bzw. AK, sondern durch KGS bedingt wurde.

WAGNER-JAUREGG und RAUEN (1935) beobachteten als erste, dass die Citricodehydrogenase die iso-Citronensäure noch viel schneller als die CS dehydriert. Ausgehend von diesem Befund kam dann MARTIUS (1937, 1938) zu seinem bekannten Abbauweg der CS über Aconit-, iso-Citronen- und  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -carboxylglutarsäure (Oxalbernsteinsäure) zu KGS, der heute ziemlich allgemein, wenn auch mit einigen Ausnahmen, anerkannt wird.

Im Zusammenhang mit ihren Befunden über den Auf- und Abbau der CS haben MARTIUS und KNOOP (1937) und MARTIUS (1938, 1939) die Theorie eines CS-Cyklus aufgestellt, wonach aus zwei Molekülen CS beim Abbau zuletzt ein Molekül Oxalessigsäure und BTS entständen, die dann wiederum zu einem Molekül CS vereinigt würden. Ein ähnlicher Kreislauf wurde von KREBS und JOHNSON (1938) für den Muskelstoffwechsel angenommen; hierbei soll jedoch die aus CS entstandene Oxalessigsäure mit einer Triose wieder zu CS kondensiert werden.

Jüngst haben ADLER, v. EULER, GÜNTHER und PLASS (1939) darauf hingewiesen, dass im Stoffwechsel aus CS über KGS Glutaminsäure gebildet werden kann, und haben die hierzu notwendigen Enzyme, die iso-Citrico-Apodehydrogenase und die Glutaminsäure-Apodehydrogenase, welche letztere unter gewissen Bedingungen in Gegenwart von Ammoniak auch die reduktive Aminierung von KGS bewirkt, aus Herzmuskelgewebe isoliert. Durch diesen interessanten experimentellen Befund ist also eine weitere Verbindungsbrücke zwischen Abbauprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels und Eiweissderivaten nachgewiesen worden, und es scheint garnicht unwahrscheinlich, dass im tierischen Stoffwechsel tatsächlich eine derartige Umsetzung stattfindet.

## 2. Über die Ausscheidung der Brenztraubensäure, Milchsäure, $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Citronensäure sowie der Acetonkörper mit dem Harn.

Im Anschluss an die ziemlich allgemein gehaltene, kurze Übersicht über den intermediären Umsatz der in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselprodukte sollen im Folgenden kurz die bisherigen Kenntnisse über die Ausscheidung dieser Verbindungen mit dem Harn referiert werden. Systematische und gleichzeitige Untersuchungen über die Ausscheidung aller dieser Säuren mit dem Harn bei Versuchstieren oder beim Menschen liegen in dem Schrifttum nicht vor.<sup>1</sup> Dagegen gibt es verhältnismässig viel Arbeiten, die sich mit der Ausscheidung der einen oder anderen dieser Verbindungen befassen oder die Einwirkung verschiedener Kostformen und die Verabreichung von Säuren, Alkalien und Salzen stoffwechselphysiologisch interessanter Verbindungen behandeln.

Ferner sind in der Literatur im Zusammenhang mit anderen experimentellen Studien über den intermediären Stoffwechsel viele versprengte Angaben über Harnuntersuchungen zu finden. Hierdurch wird eine vollständige und umfassende Durchsicht der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse weitgehendst erschwert.

Am gründlichsten und exaktesten sind die Ausscheidung der CS und die Gesetze, denen sie unterliegt, untersucht worden. Auch über die MS-Ausscheidung liegen viele Arbeiten vor, wenn auch hier meist der Einfluss körperlicher Arbeit auf die MS-Ausscheidung im Harn geprüft wurde. Dagegen ist die Ausscheidung der BTS und KGS, mit Ausnahme der in diesem Laboratorium vorgenommenen Untersuchungen so gut wie garnicht verfolgt worden.

### *Brenztraubensäure (BTS).*

Über das Vorkommen der Brenztraubensäure im Urin liegen im Schrifttum so gut wie garkeine Angaben vor. Lediglich im Zusammenhang mit Pyruvatbelastungsversuchen war früher manehmal versucht worden BTS im Harn mit der Probe von SIMON-PIAUX qualitativ nachzuweisen oder als Hydrazon zu isolieren. Aus dem Jahre 1922 liegt eine lange Studie von FRICKE vor, in welcher der Verfasser berichtet, dass er weder im normalen noch

<sup>1</sup> Bei gesunden Menschen und bei Patienten mit Diabetes, Leber- und Nierenkrankheiten wurde die Ausscheidung dieser Verbindungen jüngst von KRUSIUS und VESA (1939) untersucht.

im Diabetiker Harn mit Phenylhydrazin auch nur Spuren von BTS finden konnte.

Der Grund für das Fehlen jeglicher Befunde in der früheren Literatur über das Vorkommen und die Ausscheidung der BTS im Harn ist darin zu suchen, dass keine brauchbaren Bestimmungsmethoden bekannt waren. Erst nach Ausarbeitung der NEUBERG-CASE-Methode (1932), die auf Isolierung der BTS als 2.4-Dinitrophenylhydrazon beruht (vgl. Kapitel II), war eine, wenn auch nur annähernde, Bestimmung der BTS im Gewebe und Blut möglich.

Schon BERTHELOT und AMOUREUX (1924) berichten über das Vorkommen von BTS im menschlichen Dünndarm. MENDEL, BAUCH und STRELITZ (1931) fanden mit ihrer empfindlichen, aber umständlichen Methode BTS im Serum Krebskranker Patienten. Als 2.4-Dinitrophenylhydrazon wurde die BTS im Schweineserum von WESTERKAMP (1933) isoliert, aber nur durch Schmelzpunktbestimmung identifiziert. Auf dieselbe Art fanden auch PETERS und THOMPSON (1934) im Gehirngewebe B<sub>1</sub>-avitaminotischer Tauben, THOMPSON und JOHNSON (1935) und JOHNSON (1936) im Blut solcher Tiere BTS. Wie im folgenden Kapitel eingehender dargestellt wird, reicht die Schmelzpunktbestimmung des 2.4-Dinitrophenylhydrazons der BTS nicht zur Identifizierung. Als einziger hat JOHNSON (1936) auch Stickstoffbestimmungen des Hydrazons vorgenommen und annähernd richtige Werte erhalten.

Im Urin wurde die BTS als 2.4-Dinitrophenylhydrazon wohl zum ersten Mal von PI-SUÑER und FARRÀN (1932, 1933) bei Patienten mit kompensierter Diabetes isoliert. Diese Forscher erhielten 1936 bei der Verbrennungsanalyse mit dem theoretischen Stickstoffgehalt gut übereinstimmende Werte. Ausser dem Stickstoffgehalt wurden weder von JOHNSON (1936) noch von PI-SUÑER und FARRÀN (1936) andere Elemente ermittelt. Ferner sollen auch PLATT und LU (1936) im Harn Beriberikranker Patienten das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der BTS isoliert haben.

In diesem Laboratorium wurden seit 1936 BTS-Bestimmungen im Harn in Zusammenhang mit B-Avitaminoseuntersuchungen an Ratten und Belastungsversuchen an verschiedenen Tieren durch Reduktion der BTS zu MS ausgeführt. Schon 1930 konnten KENDALL und FRIEDEMANN mit ähnlicher Methodik in einigen konzentrierten menschlichen Morgenharnen kleine Mengen BTS finden. — Bei Patienten mit Diabetes, Leber- und Nierenkrankheiten wurde die BTS-Ausscheidung von KRUSIUS und VESA (1939) untersucht und mit der Ausscheidung im normalen Harn verglichen. Im normalen menschlichen Sammelharn von 24 Stunden wurden meist BTS-Mengen unter 100 mg gefunden, dagegen schieden einige unkompenzierte Diabetiker mehr als die zehnfache Menge BTS mit dem Harn aus.

In der Literatur liegt ferner besonders eine interessante Untersuchung über die Ausscheidung von MS und BTS nach Muskelarbeit vor (JOHNSON und EDWARDS, 1937), aus welcher hervorgeht, dass die BTS-Ausscheidung nach grosser Anstrengung genau wie die der MS bedeutend zunimmt. In den referierten Versuchen verlief die BTS-Ausscheidung derjenigen der MS zeitlich völlig parallel, wenn sie auch nur ein Drittel so gross war. Die BTS-Bestimmungen wurden nach der Methode von NEUBERG-CASE ausgeführt.

### *Milchsäure (MS).*

In diesem Zusammenhange soll auch ganz kurz einiges über die MS-Ausscheidung mit dem Harn angeführt werden. Obwohl die Bedeutung der MS im Stoffwechsel schon lange bekannt gewesen ist, war es noch bis vor kurzem eine Streitfrage, ob die MS regelmässig im Harn vorkomme. Zwar wurde die MS als Zink- oder Lithiumlaktat schon früh im Harn bei schweren Krankheiten, Vergiftungen sowie bei extremer Muskelarbeit nachgewiesen, aber erst nach dem FÜRTH und CHARNASS (1910) eine exakte Methode zur Bestimmung der MS in biologischen Substraten ausgearbeitet hatten, wurde endgültig klargelegt, dass die MS auch ein normaler Bestandteil des Harns ist.

Beim gesunden Menschen dürfte die Gesamt-MS-Ausscheidung innerhalb von 24 Stunden zwischen 100—600 mg betragen (KRUSIUS und VESA, 1939). Stark gesteigert ist die MS-Ausscheidung bei verschiedenartigen Vergiftungen, wie z. B. mit Morphin, Cocain, Strychnin, Curare, Blausäure, Phosphor, Arsenik und Amylnitrit, sowie bei schweren Krankheiten, wenigstens im Endstadium derselben. Bei allen diesen Zuständen dürfte die gesteigerte Laktaturie durch einen relativen Sauerstoffmangel der Gewebe bedingt sein, wodurch der aerobe MS-Umsatz gehemmt wird. Ebenso führen daher auch Zirkulationsstörungen, Sauerstoffmangel und sogar physiologische Ermüdungen und Überanstrengungen zu einer Anhäufung von MS im Blut und den Geweben und zu einer erhöhten Ausscheidung mit dem Harn.

Besonderes Interesse gebührt der MS-Ausscheidung nach Muskelarbeit, die von zahlreichen Forschern untersucht worden ist. Unter normalen Bedingungen beträgt die Blut-MS des Menschen bei nüchternem Magen zwischen 8—15 mg %. Bei langdauernder Muskelarbeit, bei der mehr MS gebildet wird, als zu Glycogen regeneriert bzw. völlig oxydiert werden kann, tritt eine Anhäufung von MS in den Organen und eine Überschwemmung des Blutes ein. Der Blutmilchsäurespiegel kann hierbei leicht auf das Zehn-

fache oder mehr ansteigen. Es muss angenommen werden, dass der Nierenschwellenwert weit überschritten wird und dass es folglich zu einer Eliminierung der Säure mit dem Harn kommt. Genau dasselbe Verhalten zeigt auch die Phosphorsäure. RESNITSCHENKO und KOSMIN (1929) konnten zeigen, dass die Grösse der MS- (bzw. Phosphorsäure-)Ausscheidung mit dem Harn eine direkte Funktion der Intensität der Muskelarbeit ist und dass die Wasserstoffionenkonzentration des Harns der MS-Menge proportional ist.

Erwähnt werden mag auch noch, dass bei verschiedenen Avitaminosen eine vermehrte MS-Ausscheidung zu beobachten ist (ROSENWALD, 1926), was gut damit übereinstimmt, dass bei verschiedenen B- und C-Vitaminmangelzuständen stark erhöhte Blut-MS-Werte gefunden wurden (KRUSIUS und SIMOLA, 1936, 1937). Was speziell die Karenz von B-Vitaminen anbetrifft, wissen wir ja mit Sicherheit, dass die MS-Anhäufung im Organismus durch eine Störung im Abbau der intermediären Spaltungsprodukte der Kohlenhydrate hervorgerufen wird, für welche, wie schon erwähnt, die Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren besonders charakteristisch ist.

Über den Einfluss verschiedener Kostformen auf die MS-Menge im Harn sind nicht viel Angaben in der Literatur anzutreffen. Aus den Versuchen von KAPPELLER-ADLER und LAUDA (1932) scheint hervorzugehen, dass bei vegetabilischer oder gemischter Kost mehr MS ausgeschieden wird als bei rein animalischer. Da diese Versuche aber teils mit Kaninchen oder Menschen, teils mit Hunden vorgenommen wurden und die Ergebnisse daher nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können, erlauben sie keine sicheren Schlussfolgerungen.

#### *$\alpha$ -Ketoglutar säure (KGS).*

Über die Ausscheidung der KGS mit dem Harn sind ausser in diesem Laboratorium fast noch gar keine Untersuchungen ausgeführt worden. Wie eingangs erwähnt, fand SIMOLA (1934—36) im Harn B-avitaminotischer Ratten grosse Mengen KGS. Dies war der erste experimentelle Nachweis der KGS als intermediäres Stoffwechselprodukt intra-vitam. Später wurde in diesem Laboratorium die Ausscheidung der KGS nach Verabreichung von BTS und anderen wichtigen Stoffwechselprodukten untersucht (s. weiter unten). 1938 publizierte KREBS als erster eine Methode zur quantitativen Bestimmung der KGS und berichtete in diesem Zusammenhange über 10 Harn-Untersuchungen bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten, die in 24 Stunden 10—40 mg KGS mit dem Harn ausschieden. KRUSIUS und VESA (1939) unter-

suchten die Ausscheidung von KGS bei Diabetespatienten und einigen Leber- und Nierenkranken und fanden bei den beiden zuerst genannten Krankheiten eine gewisse Erhöhung der Ausscheidung. Die KGS-Ausscheidung bei Tieren ist auch von KREBS (1938) im Zusammenhang mit einigen Belastungsversuchen untersucht worden.

### *Citronensäure (CS).*

Unsere Kenntnisse über die CS-Ausscheidung mit dem Harn und die Einwirkungen, denen sie unterliegt, sind zweifellos viel gründlicher als über die anderen hier besprochenen Säuren. Dies ist umso bemerkenswerter, als die Forschungen über den CS-Umsatz viel jüngeren Datums sind als beispielsweise die Untersuchungen über die MS.

Schon 1916 konnten SALANT und WISE nach Verabreichung von Natriumcitrat im Harn der Versuchstiere CS nachweisen. Hierzu bedienten sie sich einer Modifikation der Methode von DENIGÈS (1899, 1901), bei der die CS zu Acetondicarbonsäure oxydiert und als Komplexverbindung mit Mercurisulfat ausgefällt wird. Im folgenden Jahre zeigten AMBERG und Mc CLURE (1917), dass die CS regelmässig im Harn vorkommt, indem sie bei drei gesunden Personen eine mittlere Ausscheidung von ca. 500 mg in 24 Stunden beobachteten. Dieser erste sichere Nachweis der CS als normalem Harnbestandteil wurde mit der von STAHR (1895, 1897) angegebenen Pentabromacetone methode erbracht. 1921 konnten AMBERG und MAVER die CS als Bariumsalz aus dem menschlichen Harn isolieren und chemisch identifizieren. Ausführlichere Untersuchungen bei Kindern wurden von Mc CLURE und SAUER (1922) und bei Erwachsenen von Mc CLURE (1922) vorgenommen. Weitere Untersuchungen über das Vorkommen der CS im normalen Menschenharn wurden ausgeführt von THUNBERG (1929), ÖSTBERG (1929, 1931), FASOLD (1930), SÜLLMANN und SCHAEERER (1932), KUYPER und MATTILL (1933), FÜRTH und Mitarbeiter (1934), BOOTHBY und ADAMS (1934), SCHUCK (1934) und SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936).

Auch im Harn vieler Tierarten wurde CS als normaler Bestandteil nachgewiesen: bei Pferden von ÖSTBERG (1931), bei Kühen von ÖSTBERG (1931), bei Meerschweinchen von ÖSTBERG (1931) und FÜRTH und MITARBEITER (1934), bei Kaninchen von LANGECKER (1933) und FÜRTH und MITARBEITER (1934), bei Hunden von FÜRTH und Mitarbeiter (1934), BOOTHBY und ADAMS (1934), PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936), SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936),



ORTEN und SMITH (1937) und KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938), bei Ratten von ÖSTBERG (1931), SIMOLA und Mitarbeiter (1937)<sup>1</sup>, KREBS und JOHNSON (1938) und bei Schweinen schliesslich von WOODS (1927) und von FÜRTH und Mitarbeiter (1934).

Hauptsächlich durch die gründlichen Untersuchungen von ÖSTBERG (1929, 1931), der die CS-Bestimmungen im Harn mittels der von THUNBERG (1929) gefundenen Methylenblaumethode vornahm, haben wir eingehendere Kenntnisse über die normale und pathologische CS-Ausscheidung beim Menschen erhalten. Nach diesem Forscher sind die Normalgrenzwerte der CS-Ausscheidung des Menschen auf ca. 200—1000 mg in 24 Stunden zu veranschlagen. Er konnte ferner zeigen, dass ein naher Zusammenhang zwischen der Harnacidität und dem Citratgehalt des Harns besteht. Bei Neigung zu Alkalosis, ganz unabhängig davon, ob diese durch Verabreichung von Alkalien, durch Diätveränderungen oder durch Stoffwechselstörungen hervorgerufen wird, konstatierte ÖSTBERG stark vermehrte Citrat-Ausscheidung; bei acidotischen Zuständen der verschiedensten Ursachen (saure Diät, Verabreichung von Säuren oder säurebildenden Salzen, Stoffwechselstörungen mit Acidose u. s. w.) wiederum stark verminderte CS-Ausscheidung oder gar keine nachweisbare CS im Harn. Nach diesen Untersuchungen ist die CS von grosser Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts im Organismus und bildet ein wichtiges Puffersystem des Harns. Die CS soll nach ÖSTBERG im Harn als eine komplexe, schwach ionisierte aber lösliche Calcium-Citronensäure-Verbindung vorliegen und aus diesem Grunde vermutet er, dass die CS dazu beiträgt die Calciumsalze des Harns in Lösung zu halten.

Gesteigerte CS-Ausscheidung bei Alkalosis ist auch von vielen anderen Forschern beobachtet worden (FASOLD, 1930; MAGNUSON, 1932; SÜLLMANN und SCHAERER, 1932; LANGECKER, 1933; BOOTHBY und ADAMS, 1934; FÜRTH und Mitarbeiter, 1934; SCHUCK, 1934; SHERMAN, MENDEL und SMITH, 1936; SIMOLA und Mitarbeiter 1937—1939; ORTEN und SMITH, 1937). Jedoch hoben als erste KUYPER und MATTILL (1933) und BOOTHBY und ADAMS (1934) hervor, dass die CS-Ausscheidung nicht nur durch das Säure-Basen-Gleichgewicht reguliert werde, sondern sicherlich auch noch von anderen Umständen abhinge. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen

<sup>1</sup> In einer vorläufigen Mitteilung (KRUSIUS und SIMOLA, 1938) wurde über erhöhte CS-Ausscheidung bei B-vitaminotischen Ratten berichtet; eingehendere Untersuchungen, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, haben aber gezeigt, dass nach einer anfänglichen leichten Steigerung die CS-Werte im Harn mit Fortschreiten des Mangelzustandes eher abnehmen.

kamen in den folgenden Jahren SIMOLA und Mitarbeiter (1937—1939), ORTEN und SMITH (1937) und KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) durch Belastungsversuche mit verschiedenen Stoffwechselprodukten bei Tieren, bei denen es hiernach zu einer viel grösseren CS-Ausscheidung kam als nach Verabreichung der äquivalenten Bicarbonatmenge (s. weiter unten).

Der CS-Spiegel des Blutes ist für jedes Individuum ziemlich konstant. Nach den Untersuchungen von SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936) scheint der Nierenschwellenwert der CS bei Hunden höher zu liegen als der Blut-CS-Spiegel. Hieraus darf man wohl schliessen, dass ein grosser Teil der Harn-CS in den Nieren gebildet wird, besonders da im tierischen Körper nach den Untersuchungen von SHERMAN, MENDEL und SMITH keine so grossen Depots vorhanden sind, als die z. B. bei Alkalosis ausgeschiedenen CS-Mengen voraussetzen würden.<sup>1</sup>

In diesem Zusammenhange wäre noch einiges über den Einfluss verschiedener Kostformen auf die CS-Ausscheidung zu sagen. FASOLD (1930) fand bei gemischter und vegetabilischer Kost viel höhere Werte als bei animalischer Kost. Nach reiner Fleischnahrung waren die CS-Werte oft so niedrig, dass die untere Empfindlichkeitsgrenze seiner Methode erreicht wurde. ÖSTBERG (1931) fand bei Kohlenhydratkarenz (Petren'sche Diabeteskost: »Fett und Gemüse«) niedrige CS-Ausscheidung, die von einer Senkung des Harn-pH:s und einer Zunahme des Ammoniakgehalts begleitet wurde. Durch Verabreichung von Bicarbonat konnte er diese Wirkung der Kohlenhydrat- und Eiweisskarenz beheben. Nach den Untersuchungen von SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936) bewirkt sehr kohlenhydratreiche Diät bei Hunden eine grössere Citratausscheidung als eiweissreiche Kost.

Die Aufnahme von Nahrung soll nach KUYPER und MATTILL (1933) und SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936) eine Zunahme der CS-Ausscheidung in den ersten Harnportionen nach der Mahlzeit hervorrufen, ohne dass das Harn-pH nach der alkalischen Seite verschoben wird. Es tritt also eine von dem Säure-Basen-Gleichgewicht unabhängige, vorübergehende Zunahme der CS-Ausscheidung ein, der in den späteren Harnportionen eine verminderte Ausscheidung nachfolgt. Die Gesamtausscheidung in 24 Stunden wird durch die Nahrungsaufnahme nicht verändert. — Bei fastenden Tieren wurde ferner beobachtet, dass die CS-Ausscheidung im

<sup>1</sup> Andererseits haben aber die in-vitro-Versuche von HALLMAN (1938, 1939) gezeigt, dass die CS ziemlich leicht in den meisten tierischen Geweben gebildet wird.

Tages- und im Nachtharn gleich gross ist. (SHERMAN, MENDEL und SMITH, 1936). Die Blut-CS-Werte sollen aber bei hungernden Kaninchen sinken (KUYPER und MATTILL, 1934). — Über den Einfluss einer längeren Fastenperiode auf die CS-Ausscheidung liegen in der Literatur wohl keine Angaben vor.

### *Acetonkörper (AK).*

Auf die Literatur über die Ausscheidung von AK mit dem Harn möchte ich hier nicht näher eingehen, da mich dies zu weit ausserhalb des Themas dieser Arbeit führen würde. In meinen Untersuchungen wurden die AK nur insofern mitbestimmt, als eine Zunahme der Ausscheidung derselben mit dem Harn immer auf nicht zu vernachlässigende Stoffwechselstörungen hinweist. Besonders aber war es natürlich bei den Belastungsversuchen von grossem Interesse nachzuprüfen, ob die Verabreichung von Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels zu einer Bildung von AK führt.

In diesem Zusammenhang sei daher nur erwähnt, dass im normalen Tierharn und im Harn gesunder Menschen nur Spuren von Aceton und ganz geringe Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure (OBS) vorhanden sind. Schon starker Hunger kann zu einer Zunahme der Ausscheidung der AK führen. Grosse Mengen werden aber erst bei schweren Stoffwechselstörungen wie Diabetes und diabetisches Koma, bei denen speziell der Abbau der Acetessigsäure und der OBS gehemmt ist, ausgeschieden.

## **3. Über frühere Belastungsversuche.**

Die ersten in-vivo-Versuche zur Aufklärung des Umsatzes und der Ausnützung physiologisch wichtiger Stoffwechselprodukte liegen schon weit zurück.

### *Belastung mit Milchsäure und Brenztraubensäure.*

Die ältesten Belastungsversuche, die ich in der Literatur gefunden habe, wurden mit MS ausgeführt. Schon WEICHSE und FLECHSIG (1889) und ARAKI (1894) beobachteten bei Tierversuchen, dass Natriumlaktat die Glucose im Stoffwechsel ersetzen kann. — In neuerer Zeit konnten dagegen ABRAMSON, EGGLETON und EGGLETON (1927) sowie FLOCK, BOLLMAN und MANN (1938) nach Laktatinjektionen bei Hunden keine Zunahme des Blutzuckers feststellen; jedoch bewirkt nach den zuletzt genannten Autoren die Einspritzung von Traubenzucker, Lävulose oder Adrenalin eine starke Erhöhung der Blut-MS- und BTS-Werte.

Ausserdem ist nach MS-Belastung auch noch anderen Harnbestandteilen Beachtung geschenkt worden. So fanden ORTEN, SMITH (1937) nach Belastung mit Natriumlaktat keine Zunahme der CS-Ausscheidung im Harn von Doggen und SIMOLA und KRUSIUS (1938) unter den selben Bedingungen bei Ratten keine Veränderung in der Ausscheidung von KGS.

Am häufigsten dürften bisher Belastungsversuche mit BTS ausgeführt worden sein. Die ersten derartigen Versuche wurden ebenso wie bei Verabreichung von MS angestellt um festzustellen, ob in-vivo eine Zuckerbildung aus diesen Verbindungen zu beobachten sei. Als erster verabreichte POHL (1896) zwei Hunden 1 bzw. 2 g BTS, ohne aber im Harn der Tiere Zucker, BTS oder andere »abnorme Produkte« feststellen zu können. Ausführlichere Versuche wurden 1912 von MAYER an Kaninchen vorgenommen, wobei er bei subcutaner Verabreichung mittlerer BTS-Mengen (ca. 3 g Natriumpyruvat pro kg Körpergewicht) im Harn der Versuchstiere regelmässig Glucose (bis zu 2.4 g/24 St.) vorfand; ferner enthielt der Harn oft Spuren von Eiweiss (Nierenschädigung), d-MS und angeblich unveränderte BTS, die als essigsäures Phenylhydrazin neben dem Gucososazon ausgefällt wurde. Schliesslich war bei den Kaninchen meist Hyperglycämie nachzuweisen.

Nach DAKIN und JANNEY (1913) und RINGER (1914) soll bei Hunden mit experimenteller Phlorizindiabetes nach Verabreichung von BTS eine beträchtliche Zunahme der Zuckerausscheidung eintreten. Dagegen fand MAYER (1913) bei Versuchen mit Phlorizinvergifteten Kaninchen und Hunden nach Belastung mit BTS im Gegenteil eine Abnahme der Glucosurie. Dies erklärte dieser Forscher durch eine toxische Nierenschädigung, wodurch das Nierenfilter der Tiere für Zucker und stickstoffhaltige Harnsubstanzen undurchlässiger würde. Ähnliche Beobachtungen hatten auch schon früher BAER und BLUM (1907, 1908 u. 1911) und UNDERHILL (1912) gemacht bei Versuchen über die Zuckerbildung aus einigen Dicarbonsäuren, vor allem Glutarsäure und Weinsäure, indem die Verabreichung dieser Verbindungen bei Hunden mit Phlorizindiabetes zu einer starken Verminderung der Glucosurie oder zu ihrem Versiegen führte. — Diese negativen Versuche dürfen aber nicht ohne weiters als Beweis gegen die Bildung von Zucker aus BTS aufgefasst werden, wie MAYER selbst hervorhebt, da bei den Versuchstieren immer ernste Nierenveränderungen vorlagen.

Geringe Glucosurie beobachtete auch OTANI (1925) bei Belastung von Kaninchen und Hunden mit grossen BTS-Mengen, aber bei

weitem nicht bei allen Tieren. Gleichfalls wurde teilweise MS ausgeschieden, die entweder rechtsdrehend oder optisch inaktiv war. KARCZAG (1917) nahm als erster Belastungsversuche an Meerschweinchen und Ratten vor, kam aber in Bezug auf alle der von MAYER untersuchten Harnsubstanzen (Zucker, MS, BTS) zu völlig negativem Ergebnis.

Im Zusammenhang mit der Kohlenhydratbildung nach Belastung mit BTS muss noch erwähnt werden, dass STÖHR und HENZE (1932) bei hungernden Ratten nach Verabreichung von BTS (100—185 mg per os, neutralisiert mit  $\text{NaHCO}_3$ ) starke Glycogenbildung feststellen konnten. Endlich wäre noch zu erwähnen, dass MANN und MAGATH (1922) nach Entfernung der Leber bei Belastung mit BTS keine Zunahme des Blutzuckers fanden.

Über die Ausscheidung von Milchsäure nach Belastung mit BTS haben in neuerer Zeit SIMOLA (1937) bei Ratten und SIMOLA und KRUSIUS (1939) beim Menschen berichtet; auch MARGARIA und PONZIO (1938) und FLOCK, BOLLMAN und MANN (1937) fanden bei Versuchstieren erhöhte Laktat-Ausscheidung nach Verabreichung von BTS.

In neuerer Zeit ist vor allem der Ausscheidung einiger anderer Säuren nach Verabreichung von BTS Aufmerksamkeit geschenkt worden. 1927 fanden TOENNIESSEN und PRELL im Harn eines Kaninchen nach subcutaner Einspritzung von Natriumpyruvat eine organische Säure, die sie für Bernsteinsäure hielten. 1937 konnte SIMOLA zeigen, dass nach Belastung mit BTS grosse Mengen von KGS ausgeschieden werden. Dasselbe Ergebnis wurde später auch beim Menschen erhalten (SIMOLA und KRUSIUS, 1938—39). Dagegen war die Ausscheidung von Bernsteinsäure beim Menschen nach der Belastung nicht erhöht. SIMOLA (1937) und SIMOLA und Mitarbeiter (1938) zeigten auch als erste, dass nach Verabreichung von BTS, besonders bei Ratten eine stark erhöhte CS-Ausscheidung eintritt.

Von weiteren Wirkungen der Verabreichung der BTS auf die Zusammensetzung des Harns sei noch erwähnt, dass nach den Untersuchungen von HENSEL (1915) die Ausscheidung von Acetylverbindungen nach Belastung mit BTS stark zunimmt; u. a. wird p-Acetylaminobenzoesäure ausgeschieden. KARCZAG (1917) hebt schliesslich als erster hervor, dass der Harn der Versuchstiere nach Belastung mit brenztraubensaurem Natrium alkalisch ist und sehr viel Carbonat enthält. Hieraus schloss er, dass die BTS vom Körper völlig umgesetzt werde, während das freigewordene Alkali mit dem Harn eliminiert würde.

*Belastung mit Citronensäure.*

Schon seit LIEBIG's Zeiten ist man ziemlich allgemein der Ansicht gewesen, dass die s. g. Pflanzensäuren im Tierkörper vollständig abgebaut werden. Im Jahre 1856 wurde das Schicksal der CS im Organismus wohl zum ersten Male von PIOTROWSKI und MAGAWLY untersucht. Diese Forscher sollen zu dem Resultat gekommen sein, dass die verabreichte CS im Körper völlig abgebaut wird;<sup>1</sup> dagegen soll nach OHTA (1912) ein Teil der verabreichten CS wieder im Harn ausgeschieden werden. Die ersten gründlicheren Belastungsversuche mit CS wurden von SALANT und WISE (1916) mit Kaninchen, Katzen und Hunden vorgenommen, allerdings unter Verwendung einer etwas unsicheren chemischen Methodik. Hierbei fanden die Forscher bei oraler oder intravenöser Verabreichung der Säure keine Zunahme der CS-Ausscheidung; bei subcutaner Applikation wurde dagegen bis zu einem Viertel der gegebenen Menge im Harn wiedergefunden.

Über ähnliche Resultate berichtet auch WOODS (1927), der bei Verfütterung von grossen Mengen von Citrat und CS bei Schweinen eine Zunahme der CS-Ausscheidung beobachtete, die aber nach einiger Zeit, trotz fortgesetzter Fütterung, wieder abnahm. Dies wurde als eine Gewöhnung des Organismus angesehen. FÜRTH, MINIBECK und EDEL (1934) konnten bei Belastung von Schweinen mit 2 g freier Säure pro kg Körpergewicht keine Zunahme der CS-Ausscheidung beobachten und nach den Untersuchungen von SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936) wurde nach Belastung von Hunden mit 0.5—2.0 g CS pro kg nur ca. 0.7 % der verabreichten Menge mit dem Harn ausgeschieden, obwohl der CS-Spiegel des Blutes 3 ½—7 ½ Stunden nach der Belastung stark erhöht war. Auch mit dem Kot wurde bei diesen Versuchen keine CS ausgeschieden. Diese Belastung mit freier Säure hatte keinen Einfluss auf das pH des Harns und die Stickstoffausscheidung.

Die ersten Belastungsversuche mit CS beim Menschen wurden von GONCE und TEMPLETON (1930) ausgeführt. Diese Forscher konnten bei dreitägiger Verabreichung von 600 mg CS pro Körperkg (als freie Säure) bei vier Kindern keine Zunahme der Citrat-ausscheidung im Harn feststellen. Eingehender wurde der Umsatz oral verabreichter CS beim Menschen untersucht von ÖSTBERG (1931). Die Verabreichung von bis zu 40 g CS (unneutralisiert) verursachte meist keine Steigerung in der Ausscheidung der CS, in einigen Fällen trat im Gegenteil eine Abnahme der Ausscheidung

<sup>1</sup> referiert nach ÖSTBERG (1931).

ein, die ÖSTBERG durch eine Veränderung des Säure-Basen-Gleichgewichts erklärt. Hierdurch erklärt sich auch das verschiedenartige Verhalten einzelner Individuen bei der Belastung. Findet eine Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts nach der sauren Seite statt, kommt es trotz Zufuhr von CS zu einer verminderten Ausscheidung; wird dies Gleichgewicht nicht gestört, kann es in einzelnen Fällen zu einer gesteigerten Ausscheidung kommen. Auf jeden Fall wird aber nach ÖSTBERG nach Verabreichung von CS als freie Säure beim Menschen günstigstens Falls nur ein geringer Bruchteil der gegebenen Menge im Harn wiedergefunden. Bei Belastung mit Natriumcitrat stellte ÖSTBERG dagegen eine ebenso grosse CS-Ausscheidung fest, wie bei Applikation der entsprechenden Alkalimenge, sodass hier die Zunahme als Alkaliwirkung zu deuten wäre.

Nach KUYPER und MATTILL (1933) entgingen nach Verabreichung von 2—20 g freier CS an fastende Personen oder an Personen auf konstanter Diät nur ca. 1.5—2.5 % der Säure der Verbrennung; SCHUCK (1934) fand nach acht Tage langer Belastung mit tägl. 12 g CS bei 3 Versuchspersonen keine zusätzliche CS-Ausscheidung im Harn, bei drei anderen Versuchspersonen entgingen zwischen 1.6—3.6 % der verabreichten Menge der Oxydation.

Auch einige Untersuchungen über den Einfluss der CS auf die Kohlenhydratbildung im diabetischen Organismus liegen in der Literatur vor. Schon 1905 hatte SATTA eine »antiketogene« Wirkung der CS bei Diabetikern angenommen. BAER und BLUM (1911) und LUSK (1912) fanden bei Verabreichung von CS an Hunde mit Phlorizindiabetes eine Zunahme der Glucosurie, dagegen aber keine »antiketogene« Wirkung. Auch bei einem Diabetiker soll nach Verabreichung von CS eine Zunahme der Zuckerausscheidung eingetreten sein. FÜRTH, MINIBECK und EDEL (1934) glaubten bei einem Hunde mit experimenteller Adrenalin-Glucosurie bei gleichzeitiger Überschwemmung des Organismus mit Natriumcitrat eine schnell abklingende alimentäre Citraturie feststellen zu können, was auf eine Hemmung der CS-Verbrennung im diabetischen Organismus zu deuten schien. Nach all dem bisher gesagten über die CS-Ausscheidung wie auch besonders weil jegliche Angaben über die Acidität des Harns bei diesem Versuch fehlen, scheint es mir jedoch unbedingt erforderlich dieses Ergebnis nachzuprüfen, ehe so weitgehende Schlüsse gezogen werden.

In letzter Zeit ist in diesem Laboratorium die Ausscheidung von KGS nach Belastung mit CS untersucht worden, wobei be-

obachtet wurde, dass bei Ratten die perorale Verabreichung von Natriumcitrat zur Ausscheidung beachtenswerter Mengen KGS führt (SIMOLA und KRUSIUS, 1938). Auch KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) fanden bei Kaninchen Zunahme der KGS-Ausscheidung nach intravenöser Infusion verdünnter Citratlösung.

### *Belastungen mit anderen organischen Säuren.*

Ausser den erwähnten Versuchen mit MS, BTS und CS sind schon seit langen Zeiten eine ganze Reihe anderer Säuren zu Belastungsversuchen verwendet worden. Hierbei wurde das Augenmerk vor allem auf solche Verbindungen gerichtet, die eventuell selbst als Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels in Frage kamen oder wenigstens theoretisch in Beziehung zum Umsatz der hier untersuchten Verbindungen gesetzt werden konnten. Bei all diesen Versuchen beachtete man vor allem zwei Fragen: 1) ob die betreffende Verbindung im Tierkörper vollständig umgesetzt wird oder grössten Teils unverändert im Harn wiederzufinden ist, und 2) ob es bei den Belastungsversuchen zur Bildung anderer wichtiger Stoffwechselprodukte kommt, die als Umwandlungsprodukte der verabreichten Substanz anzusehen sind.

Was die erste Frage anbetrifft sollen hier nur einige im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtige Befunde hervorgehoben werden. Der Abbau und Umsatz der gewöhnlichen aliphatischen Fettsäuren (Monocarbonsäuren) ist schon kurz behandelt worden. Die normalen niederen Dicarbonsäuren bis  $C_5$ , werden mit Ausnahme der Oxalsäure, welche sehr giftig ist, im Tierkörper leicht verbrannt. Ebenso verhalten sich die entsprechenden Oxydicarbonsäuren mit Ausnahme der Weinsäure.

Diese Tatsache ist schon seit LIEBIGS Zeiten allgemein bekannt, wurde aber auch in neuerer Zeit für viele Säuren experimentell nachgewiesen. So stellte u. a. OHTA (1912) fest, dass die l-Äpfelsäure im Tierorganismus zum überwiegenden Teil umgesetzt wird; nur nach Verabreichung besonders grosser Mengen wurden bis zu 5 % unveränderter Säure mit dem Harn ausgeschieden. Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die Bernsteinsäure gelangten ausser LONGO (1877, 1878) auch ANDERSEN (1926) und BERNHARD und ANDREAE (1936).

Die höheren, gesättigten Dicarbonsäuren werden dagegen nur wenig ausgenützt, und zwar soll die Verbrennbarkeit mit Zunahme der C-Atomzahl bzw. Methylengruppe abnehmen, obwohl die höheren Säuren im Tierversuch am wenigsten giftig sind. Die nächsthöhere Säure nach der Bernsteinsäure, die Glutarsäure mit



fünf C-Atomen, soll nach den Untersuchungen von BAER und BLUM (1907) noch grössten Teils umgesetzt werden. Bei Phlorizindia-betischen Hunden haben diese Forscher nach Injektion der Säure, die nach ROSE (1924—25) die giftigste aller Dicarbonsäuren ist und starke Nierenschädigungen hervorruft, qualitativ geringe Mengen Bernsteinsäure im Harn gefunden. Dieser Befund ist bisher nicht bestätigt worden, scheint auch sehr fraglich, wie FLASCHENTRÄGER (1926) hervorhebt, weil theoretisch aus der Glutarsäure durch  $\beta$ -Oxydation wohl Malonsäure entstehen sollte.

Die folgende Säure in der Reihe, die Adipinsäure mit sechs C-Atomen wird dagegen meist zu über 50 % unverändert mit dem Harn wieder ausgeschieden (MORI, 1918; ANDERSEN, 1926; FLASCHENTRÄGER, 1926). Jedoch kleine Mengen der Säure können unter gewissen Umständen besser verbrannt werden (FLASCHENTRÄGER, 1926). Abbauprodukte der Säure sind bisher im Harn nicht nachzuweisen gewesen; als erstes Produkt käme bei der  $\beta$ -Oxydation die Bernsteinsäure in Frage, welche aber gleich weiter abgebaut wird.

Die noch höheren Dicarbonsäuren werden scheinbar noch weniger ausgenützt. Schon BAER und BLUM (1908) prüften die Pimelinsäure ( $C_7$ ), Korksäure ( $C_8$ ), Acelainsäure ( $C_9$ ) und Sebacinsäure ( $C_{10}$ ) im Tierversuch bei Phlorizindiabetes und fanden zwischen 40—60 % der Säuren im Harn wieder. Zu demselben Ergebnis gelangte auch FLASCHENTRÄGER (1926). Als Abbauprodukte konnten im Harn der Versuchstiere oft geringe Mengen der zwei bzw. vier C-Atome weniger enthaltenden entsprechenden Dicarbonsäuren nachgewiesen werden, wodurch die  $\beta$ -Oxydation dieser Säuren erwiesen war (VERKADE, VAN DER LEE und VAN ALPHEN, 1935; FLASCHENTRÄGER und BERNHARD, 1936).

Den schwachen Abbau der höheren Dicarbonsäuren hat man mit einer Hemmung der  $\beta$ -Oxydation durch die zweite freie Carboxylgruppe zu erklären versucht. Diese Auffassung wird gestützt durch den Befund von FLASCHENTRÄGER (1926) und FLASCHENTRÄGER und BERNHARD (1938), dass das Halbamid oder Halbanilid dieser Säuren im tierischen Organismus beinahe vollständig verbrannt wird.

Zu erwähnen wäre ferner noch, dass nach einer jüngst erschienenen Untersuchung von EMMERICH (1939) auch die Methyl-derivate vieler Dicarbonsäuren sehr wenig umgesetzt werden. Die Methyl-adipinsäure wird zu über 60 % unverändert mit dem Harn ausgeschieden, aber auch die Methylbernsteinsäure (Itaconsäure),

Methylfumarsäure (Mesaconsäure) und Methylmaleinsäure (Citraconsäure) werden grössten Teils nicht verbrannt.

Von Tricarbonensäuren interessiert hier nur die CS, über deren Abbau und Umsatz schon ausführlich berichtet wurde.

Was die zweite Frage anbetrifft sind schon eine ganze Reihe Belastungsversuche erwähnt worden, die ausgeführt wurden um die Bildung von Kohlenhydraten aus intermediären Stoffwechselprodukten zu untersuchen.

In früheren Jahren schenkte man ferner vor allem der MS-Ausscheidung viel Beachtung. So berichteten BLUM und WÖRINGER (1920) über Ausscheidung von MS nach Darreichung von Propionsäure, wodurch sie glaubten den Beweis einer  $\alpha$ -Oxydation in-vivo erbracht zu haben. KNOOP und JOST (1923) prüften eine ganze Reihe von Säuren in Bezug auf ihren Einfluss auf die MS-Ausscheidung mit dem Harn, indem sie die Natriumsalze der Säuren Hunden in verdünnten Lösungen intravenös oder subcutan einverleibten. Die stärkste MS-Bildung beobachteten sie hierbei nach Verabreichung von OBS und Propionsäure, Buttersäure lieferte weniger, Essigsäure und Bernsteinsäure verhielten sich negativ. Auch nach Ameisen-, Malon- und Chloressigsäureeinspritzung wurde MS-Ausscheidung festgestellt, ist aber nach diesen Forschern wohl als Giftwirkung zu erklären. — Schliesslich ruft auch die intravenöse Injektion grosser Mengen Glucose oft eine Steigerung der MS-Ausscheidung hervor (MORACZEWSKI und LINDNER, 1921). Dass ebenfalls die BTS zu MS-Ausscheidung Anlass gibt, ist schon in anderem Zusammenhang erwähnt worden.

In letzterer Zeit ist vor allem die Ausscheidung der CS nach Verabreichung vieler wichtiger Stoffwechselprodukte untersucht worden. Schon FÜRTH, MINIBECK und EDEL (1934) konstatierten bei einem Jungschwein, dass die Zugabe von Natriumacetat zur täglichen Kost eine starke Vermehrung der CS-Ausscheidung hervorrief, wobei der Harn allerdings stark alkalisch war. Die Verabreichung von MS, Äpfelsäure (als Natriumsalze), Oxalessigsäure (als Ester), und Alkohol und Glycerin hatte dagegen keinen Einfluss auf die CS-Ausscheidung. ORREN und SMITH (1937) untersuchten die CS-Bildung bei Hunden und fanden, dass die Natriumsalze der Malon-, Bernstein-, Fumar-, Äpfel- und (bei einem Tier) Maleinsäure die grösste Zunahme der CS-Ausscheidung bewirkten, obgleich sie nur eine geringe Verschiebung des Harn-pH:s nach der alkalischen Seite hin verursachten. Aus diesen Ergebnissen schliessen die Forscher, dass alle die genannten Verbindungen oder deren Umsatzprodukte im Stoffwechsel als Ausgangsstoffe

für die CS-Bildung in Frage kommen. (Bei den Versuchen wurden die Salze in Mengen von 100 mg Natrium pro kg Körpergewicht injiziert). Auch in diesem Laboratorium ist die nämliche Frage schon einleitend geprüft worden. SIMOLA, KRUSIUS und ALAPEUSO (1938) fanden bei oraler Belastung von Ratten eine starke CS-Aussecheidung bei Verabreichung von BTS, KGS, Fumar-, Äpfelsäure, OBS und Aetessigsäure (Dosis 0.5—1.0 g Säure, neutralisiert mit Alkali). Nach BTS-Belastung war die Erhöhung der CS im Harn ea. 30-fach, bei den anderen Säuren mit Ausnahme der Aetessigsäure etwa 50—70-fach. Auch KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) beobachteten bei Kaninehen die Bildung von CS aus Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure. SIMOLA und KOSUNEN (1938) haben dann noch eine ganze Reihe anderer Substanzen bei Ratten nach Verabreichung Natrium äquivalenter Mengen der Salze (600 mg Natrium pro kg) auf ihre CS-bildende Fähigkeit hin untersucht. Die stärkste Wirkung wurde hierbei durch Brenztraubensäurealdol, Glutarsäure und Malonsäure erreicht, am schwächsten wirkten Glueon-, Adipin- und Oxalessigsäure (Enolform), jedoch schien auch ihre Wirkung stärker zu sein als die der entsprechenden Natriumbicarbonatmenge.

Von KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) und SIMOLA und KRUSIUS (1938) ist schliesslich noch die Wirkung der Belastung mit den im Vorhergehenden aufgezählten Substanzen auf die KGS-Aussecheidung untersucht worden. Die ersteren Forscher benutzten Kaninehen als Versuchstiere, denen sie Fumar-, Oxalessig-, l-Äpfel-, Bernstein- und Malonsäure in molarem Verhältnis intravenös einspritzten (als Natriumsalze). Alle die genannten Verbindungen riefen neben starker CS-Aussecheidung auch eine grosse Zunahme der KGS-Bildung hervor. Nur die »unphysiologische« Malonsäure bewirkte eine sehr geringe Vermehrung der CS- und KGS-Aussecheidung, wogegen viel Bernsteinsäure im Harn gefunden wurde. SIMOLA (1938) beobachtete bei Ratten nach Belastung mit OBS starke KGS-Zunahme im Harn und SIMOLA und KRUSIUS (1938) ausser nach Verabreichung der von Krebs untersuchten Säuren auch nach einigen anderen, wie z. B. CS, KGS u. a. Alle diese Verbindungen hatten aber nach den ersten orientierenden Versuchen keinen Einfluss auf die MS- und BTS-Aussecheidung.

Schliesslich sei noch erwähnt, dass HUSZÁK (1935) bei subcutaner oder intravenöser Verabreichung von Malonat an Versuchstiere AK im Harn fand; hatte man neben Malonat auch Fumarat gegeben, wurde kein Aeton, dagegen aber Oxalessigsäure ausgeschieden.

## II. Chemische Methodik.

### I. Methoden zur Bestimmung der Gesamt- $\alpha$ -Ketosäuren.

Bis vor kurzer Zeit war die BTS die einzigste genauer bekannte und im tierischen Stoffwechsel nachgewiesene  $\alpha$ -Ketosäure. Ein grosser Teil der bisher verwendeten Bestimmungsmethoden der BTS beruht daher auch auf ihren Eigenschaften als  $\alpha$ -Ketosäure, der allgemeinen Struktur R-CO-COOH.

So reagiert die Carbonylgruppe z. B. mit Natriumbisulfit genau wie Aldehyde unter Bildung einer komplexen Verbindung, die erst in alkalischer Lösung wieder gespalten wird. (A). Auch mit Hydrazinen reagiert die Carbonylgruppe unter Bildung von Hydrazonen, von denen besonders einige Phenylhydrazone geeignet sind zur Isolierung der  $\alpha$ -Ketosäuren. (B). Ferner können die  $\alpha$ -Ketosäuren leicht decarboxyliert werden, wobei man die entstehende Kohlensäure manometrisch bestimmen kann. (C). Auch lassen sich die Säuren chemisch direkt zu der folgenden niedrigeren Fettsäure oxydieren und bestimmen. (D).

Nachdem die KGS als wichtiges tierisches Stoffwechselprodukt nachgewiesen worden ist, müssen alle diese Bestimmungsmethoden der BTS nicht mehr als völlig spezifisch angesehen werden und sind daher in dieser Form wohl hauptsächlich nur als Methoden zur Bestimmung der Gesamt- $\alpha$ -Ketosäuren zu verwenden.<sup>1</sup>

Hier soll daher nur kurz, unter Hervorhebung der Fehlerquellen über derartige Methoden berichtet werden.

---

<sup>1</sup> Es dürfte auch kein Zweifel darüber bestehen, dass im tierischen Stoffwechsel ausser der BTS und KGS noch andere  $\alpha$ -Ketosäuren vorkommen, wenn auch vielleicht in sehr geringen Mengen; es sei hier nur an die Oxalessäure und Phenylbrenztraubensäure erinnert.

### A. Bisulfitmethode.

Diese Methode wurde von CLIFT und COOK (1932) angegeben. Nach Ausfällen der Eiweisskörper mit Trichloressigsäure und Zusatz von NaOH bis zu pH 2—2.5 werden die Carbonylverbindungen durch Zusatz überschüssigen Bisulfits abgefangen. Dann wird der Überschuss an Natriumbisulfit mit Jodlösung oxydiert, die Carbonyl-Bisulfitverbindung durch Zusatz von Natriumbicarbonat oder sekundärem Natriumphosphat gespalten und das freigewordene Bisulfit jodometrisch bestimmt.

Auf diese Art und Weise werden alle Carbonylverbindungen der Probe bestimmt, so u. a. ausser BTS und KGS, Acetaldehyd, Aceton und Acetessigsäure, Methylglyoxal, Dihydro-oxyaceton, Glycerinaldehyd sowie andere in physiologischen Substraten vorkommende Carbonylverbindungen.

Zur Verbesserung dieser Methode wurde von CLIFT und COOK das Kochen der Analysen mit Alkali vor dem Sulfit-Zusatz vorgeschlagen. Hierbei sollen alle alkalilabilen Verbindungen wie Acetaldehyd, Methylglyoxal, Dioxyaceton, Glycerinaldehyd etc. bis auf wenige Prozent zerstört werden, während die  $\alpha$ -Ketosäuren bis zu 93 % erhalten bleiben. Nach Untersuchungen von PETERS und THOMPSON (1934) und JONG und PICARD (1937), sowie aus eigener Erfahrung ist aber das Alkalikochen zur Entfernung störender Substanzen bei Blut- oder Gewebestimmungen ungenügend. Andererseits kann man bei Bestimmungen im normalem Blut nach dem Alkalikochen oft etwas grössere Werte finden. (KRUSIUS und VESA, 1939).

Bei dieser Methode gibt es aber auch noch andere Fehlerquellen. ELLIOT, BENOY und BAKER (1935) zeigten, dass bei der ursprünglichen Methode von CLIFT und COOK meist ein Verlust von bis zu 20 % BTS eintritt. Dies beruht darauf, dass nach Zusatz von Bicarbonat ein Teil des freigewordenen Bisulfits verschwindet. Dies soll vermieden werden können durch Eiskühlung der Analyse oder durch Benutzung von sekundärem Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) statt dem Carbonat. Nach v. LUPIN (1936) muss die Carbonyl-Bisulfit-Verbindung wenig dissoziiert sein ( $K < 10^{-4}$ ), da sonst bei der Titration Verluste eintreten. Nach meinen Erfahrungen dürfte dies gerade bei BTS-Bestimmungen mittels dieser Methode der Fall sein, selbst bei Verwendung von Phosphat; dagegen lässt sich Acetaldehyd mit Bisulfit 100 % bestimmen. (vgl. die MS-Bestimmung).

Zu erwähnen ist noch, dass die Bisulfitmethode nur für Blut- und Gewebe-Extrakt-Bestimmungen verwendbar ist; bei Harnbestimmungen ist es unmöglich den Endpunkt der Titrierungen genau zu bestimmen und werden nach der Spaltung der Bisulfit-Komplex-Verbindung sehr grosse Jodmengen bis zur Blaufärbung mit Stärke verbraucht.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nach unveröffentlichten Untersuchungen von R. NÄRVÄNEN.

## B. Methoden, die auf der Isolierung der $\alpha$ -Ketosauren (bzw. BTS) als Hydrazone beruhen.

Zur Isolierung einzelner Carbonylverbindungen (u. a. BTS, Methylglyoxal) sind schon lange verschiedene Hydrazine verwendet worden. Von vielen geprüften Hydrazinverbindungen erwies sich zum Nachweis von Carbonylverbindungen das 2.4-Dinitrophenylhydrazin am geeignetsten. Dies wurde zum ersten Male von BÜLOW und SEIDEL (1924) vorgeschlagen; NEUBERG und KOBEL (1928) gebrauchten es dann als erste bei dem Nachweis von Methylglyoxal bei der Hefegärung. 1931 arbeiteten SIMON und NEUBERG eine quantitative Methode zur Bestimmung von BTS, Methylglyoxal und Acetaldehyd als 2.4-Dinitrophenylhydrazone aus.<sup>1</sup> Die Trennung der drei Hydrazone geschah folgendermassen: BTS—2.4—Dinitrophenylhydrazon wurde in kaltem Soda gelöst, in der die anderen Hydrazone unlöslich sind. (Das Hydrazon der KGS löst sich aber auch in Sodal). Aus der rotbraunen Sodalösung wurde es mit Salzsäure ausgefällt, gewaschen, getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Der Rückstand nach der Entfernung des Hydrazons der BTS wurde mit 94 % heissem Alkohol behandelt, wobei sich das Hydrazon des Acetaldehyds löst, während das Bis-dinitrophenylhydrazon des Methylglyoxals darin völlig unlöslich ist. Nach ihrer Trennung werden die beiden Hydrazone ebenfalls mit Salzsäure ausgefällt und jedes für sich durch Wägen ermittelt.

Diese Methode berücksichtigt die Hydrazone der AK ebenso wenig wie das Hydrazon der KGS, das sich chemisch dem der BTS sehr ähnlich verhält. Von CASE (1932) wurde basierend auf die Untersuchungen von NEUBERG eine Methode ausgearbeitet, die in einer Modifikation von PETERS und THOMPSON (1934) noch heute meistens zur Bestimmung der BTS verwendet wird. Das Prinzip ist folgendes: 1. Ausfällung der Carbonylverbindungen aus dem mit Trichloressigsäure enteiwässerten Substrat. 2. Mehrfache Extraktion mit Äthylacetat bis keine Spuren von Hydrazin mehr in die Ätherschicht übergehen. 3. Mehrfache Extraktion der kombinierten Äthylacetatfraktionen mit alkalischem Phosphat,  $\frac{1}{3}$  Volumen, bis keine Farbe mehr in das Phosphat übergeht. Die erste Extraktion wird nach PETERS mit gesättigter  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Lösung vorgenommen, die folgenden mit  $\frac{1}{15}$  mol. Lösung. Das Phosphat soll nur das Hydrazon der BTS aufnehmen, während das überschüssige Hydrazin und die anderen Hydrazone nicht gelöst werden sollen. (Es steht jedoch fest, dass wenigstens das Hydrazon der KGS genauso gut in Phosphat aufgenommen wird.)

<sup>1</sup> In Gegenwart von Triosephosphorsäure kann das Methylglyoxal aber nicht derart bestimmt werden, da das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der Triosephosphorsäure so unbeständig ist, dass es bei der Ausfällung zum grossen Teil in das Methylglyoxal-bis-hydrazon übergeht. (MEYERHOF und LOHMANN, 1934). Durch diesen Befund ist das Auftreten des Methylglyoxals als Zwischenprodukt bei der Glyeolyse (NEUBERG) sehr unwahrscheinlich geworden. Auch das Vorkommen von Methylglyoxal im Harn bei B-Avitaminosen ist nach den Untersuchungen von SIMOLA (1939) sehr fraglich.

4. Die vereinten Phosphatfraktionen werden mit Salzsäure angesäuert und wiederum mit Äthylacetat extrahiert bis keine Farbe mehr aus der Wasserschicht in die Acetatschicht übergeht. 5. Wiederholung der Prozedur in Punkt 3.—6. Wiederholung von 4, danach wird Alkali bis zu pH 2.5 zugesetzt. 7. Eindunsten des Äthylacetats, eventuell im Vakuum. 8. Der Rückstand wird in alkoholische Kaliumhydroxydlösung aufgenommen und kolorimetrisch nach dem Prinzip von BARRENSCHEEN und DREGUS (1931) bestimmt. (Als Vergleichslösung dient 1 mg BTS, ausgefällt als Hydrazon und gelöst in 50 cm<sup>3</sup> der Lauge.)

Mit dieser Methode soll man noch 0.15 mg BTS mit grosser Genauigkeit bestimmen können. Über eine chemische Identifizierung (Verbrennungsanalyse etc.) des Rückstandes nach Verdampfen des Essigesters habe ich keine Angaben gefunden. — Von PETERS und THOMPSON wurde diese Methode zu Blut- und Gewebestimmungen benutzt, in der neueren Literatur sind aber auch einige Harnanalysen mit dieser Methode zu finden.

THOMPSON und JOHNSON (1935) haben zur Reinigung des Rückstands nach Entfernung des Essigesters auch folgendes Verfahren angegeben: Der Rückstand wird mit gewöhnlichem Petroleum gewaschen, dann wieder in Äthylacetat aufgenommen und gereinigt durch neue Extraktion mit Phosphat. Danach wieder Ansäuerung mit HCl und Extraktion mit Acetat. Dies soll 5 mal wiederholt werden. Dann wird der Essigester-auszug mit Wasser gewaschen, auf pH. 2.0 gebracht und eingedunstet auf einige cm<sup>3</sup>. Danach soll das Hydrazin mit Petroleum ausgefällt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet werden. Das so gereinigte Produkt soll sich mit roter Farbe in alkoholische KOH lösen; der Schmelzpunkt variierte zwischen 210—220° (Mittel 216°). Synthetisches BTS-dinitrophenylhydrazon schmilzt bei 214° (ALLEN 1930, CASE, 1932), 216° (NEUBERG und KOBEL, 1929) und 219° (LOHMANN und MEYERHOF, 1934), 220° (SIMOLA, 1936).<sup>1</sup>

Wie aus der obigen Beschreibung zu ersehen ist, ist diese Methode sehr umständlich und zeitraubend. Die Extraktion des Essigesters mit Phosphat und umgekehrt ist sehr viele Male nacheinander zu wiederholen, da immer noch geringe Farbspuren übergehen. Andererseits wird aber durch dieses so lang fortzusetzende Extrahieren die Methode ungenauer, auch löst das Phosphat bei sehr häufigen Schütteln immer wieder beträchtliche Mengen Hydrazin aus der Essigesterschicht, was zu Verunreinigungen des Endproduktes führen muss.

Vor allem aber ist als schwerwiegendste Bemerkung gegen diese Methode anzuführen, dass es nicht bewiesen ist, dass der Rückstand nach Eindampfen des Äthylacetats tatsächlich nur BTS-2.4-dinitrophenylhydrazin enthält. Selbst wenn die Hydrazone von Aldehyden u. a. Carbonylverbindungen nicht durch Phosphat gelöst werden, steht doch einwandfrei fest, dass das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der KGS sich genau wie dasselbe der BTS verhält. — Nun löst sich zwar das Hydrazon der KGS mit gelbbrauner Farbe in alkoholische Laugenlösung, während diesselbe Menge der

<sup>1</sup> nach persönlicher Mitteilung von SIMOLA.

BTS eine tiefrote Farbe gibt. Enthält aber die Analyse viel KGS und nur wenig BTS, wie das z. B. bei Belastungen oft der Fall ist, verändert die gelbbraune Tönung der KGS die rote Farbe der BTS ganz sicherlich und stört folglich bei der photometrischen Bestimmung.

Was die Untersuchungen des gereinigten Rückstands nach den Angaben von THOMPSON und JOHNSON anbetrifft, sei hier noch erwähnt, dass der Schmelzpunkt des 2.4-Dinitrophenylhydrazons der synthetischen KGS 223—224° beträgt (KREBS 1933, SIMOLA, 1936), also sehr nahe demjenigen desselben Hydrazons der BTS (214—220°) liegt. Das von KREBS im Nierengewebe isolierte 2.4-Dinitrophenylhydrazon der KGS zeigte einen Schmelzpunkt von 217—222°, das im Harn B-avitaminotischer Ratten nach SIMOLA 223—224°. Wie man sieht ist also die Schmelzpunktsbestimmung zur Identifizierung des nach der Methode von PETERS und THOMPSON erhaltenen Hydrazons bei weitem nicht ausreichend.

Von LU (1938) ist die Methode von CASE zu einer Mikromethode für Blutanalysen ausgearbeitet worden. Die Methode soll schnell, spezifisch und sensitiv für BTS-Bestimmungen sein. (1:5.000.000; in 10 cm<sup>3</sup> werden 2  $\gamma$  mit  $\pm 1.5\%$  Fehler bestimmt.) Bei genauer Befolgung der Methodik sollen erst 7.5  $\gamma$  KGS einen ebenso starken Ausfall des photoelektrischen Kolorimeter geben wie 1  $\gamma$  BTS. Daher vertritt Lu die Ansicht, dass die KGS bei Blutbestimmungen mit ihrer Methode vernachlässigt werden kann. Zur Bestimmung bedarf Lu nur 2—3 Tropfen Blut oder 0.2 cm<sup>3</sup>.

Da in dieser Arbeit keine Blutbestimmungen vorgenommen wurden, werde ich hier nicht näher auf diese Methode eingehen. Zur Diskussion sei hier nur die Frage gestellt, ob die KGS bei Bestimmungen im B-avitaminotischen Blut nicht doch zu falschen Ergebnissen Anlass gibt. Bekanntlich sind die Bisulfitwerte in derartigem Blut viel grösser als die auf verschiedene Art und Weise ermittelte BTS. Andererseits scheiden B-avitaminotische Ratten nach SIMOLA grosse Mengen KGS mit dem Harn aus, dagegen kaum BTS. Es liegt daher die Annahme sehr nahe zur Hand, dass die hohen Bisulfitwerte wenigstens teilweise durch KGS bedingt werden. Ferner hat Lu bei ihrer Methode die Acetessigsäure nicht berücksichtigt; diese reagiert bekanntlich mit Hydrazin genau wie die  $\alpha$ -Ketosäuren.

Da die Methode von PETERS und THOMPSON aus den oben angeführten Gründen nicht als exaktes Verfahren zur Bestimmung der BTS angesehen werden kann, wurden in dieser Arbeit keine Bestimmungen nach ihr ausgeführt. Jedoch führte ich anfangs eine ganze Reihe methodischer Versuche mit ihr aus. Hierbei schien es mir angebracht, dass Hydrazon nicht kolorimetrisch zu bestimmen, wegen der eventuellen Störung durch das Hydrazon der KGS. Nach meinem Dafürhalten kann aber die Methode eventuell in Frage kommen bei Bestimmung des Gesamtgehalts von  $\alpha$ -Ketosäuren, nur muss das Mischhydrazon der KGS und BTS dann gravimetrisch oder titrimetrisch bestimmt werden. Bei der titrimetrischen Bestimmung wird das Hydrazongemisch in 1/100 n NaOH (genau abgemessene Menge) gelöst. Die zur Neutralisierung der freien Carboxylgruppe des Hydrazons verbrauchte NaOH wird dann durch Titration der überschüssigen Base



mit 1/100 n  $H_2SO_4$  ermittelt. Parallel muss natürlich immer eine Blindprobe titriert werden zur Eliminierung des NaOH-Verbrauchs der Luftkohlensäure. (Indikator: Phenolrot.) Mit beiden Methoden erhielt ich in wässriger Pyruvatlösung zufriedenstellende Ausbeuten (vgl. Tabelle Nr. 1):

Tabelle Nr. 1.

*BTS-Bestimmungen in reinen Lösungen nach Neuberg-Case.*

	Zugesetzt mg	Gefunden mg	Ausbeute %
Gravimetrische Bestimmung . . . .	3.0	2.87	95.7
„ „ „ . . . .	1.5	1.00	66.7(?)
Titrimetrische Bestimmung . . . .	5.0	4.59	91.8
„ „ „ . . . .	5.0	4.98	99.6

Dagegen fand ich bei Bestimmungen im Blut und Urin, bei Verwendung kleinerer Mengen (10—20 cm<sup>3</sup> Harn) völlig unmögliche Werte und die Parallellbestimmungen schwankten sehr stark. Für derartige Bestimmungen müsste man zweifellos viel grössere Blut- bzw. Harnquantitäten verwenden. Wenn die unterste Empfindlichkeitsgrenze mit PETERS und THOMPSON auf 0.15 mg angesetzt wird, müssten zu Harnbestimmungen mindestens 50, zu Blutbestimmungen aber ca. 150 cm<sup>3</sup> verwendet werden. Solche Mengen kommen bei Rattenversuchen natürlich garnicht in Frage. —

Zum Nachweis der BTS hat man auch vielfach andere Verbindungen verwendet als Hydrazine. So wurde von KOSTYTSCHEW und SOLDATENKOW (1927, 1928) die BTS bei der alkoholischen Hefegärung als Semicarbazon abgefangen. HAHN und NIEMER (1934) und HAHN, NIEMER und FISCHBACH (1936) bestimmten die BTS im Muskel, indem sie das Semicarbazon in Phenylhydrazon umsetzten und gravimetrisch bestimmten. Es braucht hier nicht weiter erwähnt werden, dass diese Methoden ebenso wenig spezifisch für BTS sind wie die Hydrazon-Verfahren, da bekanntlich die meisten Aldehyde, Ketone und Ketosäuren mit Semicarbazid reagieren.

In den letzten Jahren ist ferner als Isolierungsmittel von Carbonylverbindungen das 2.4-Dinitrophenylhydrazid verwendet worden, das dem gleichen Hydrazin überlegen sein soll.

### C. Carboxylase-Methoden.

Der Vollständigkeit halber sei die Carboxylase-Methode von WARBURG, KUBOWITZ und CHRISTIAN (1930) erwähnt, die von WESTERKAMP (1933) für Serumbestimmungen weiter ausgearbeitet wurde. Diese Methode, die auf der manometrischen Messung der Kohlensäurebildung beruht, ist ziemlich umständlich und dürfte für Harnbestimmungen nicht in Frage kommen. Wie WESTERKAMP gezeigt hat, werden mit dieser Methode alle  $\alpha$ -Ketosäuren bestimmt, also ausser BTS und KGS auch noch sehr seltene Verbindungen wie  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure,  $\alpha$ -Ketocaprinsäure und  $\alpha$ -Ketobernsteinsäure (Oxalessigsäure), wenn auch die

Decarboxylierungszeit dieser Säuren sehr verschieden ist (BTS nur 60', KGS 1000').

Von MENDEL, BAUCH und STRELIT (1931) wurde ferner eine biologische Methode beschrieben, der das Prinzip zu Grunde liegt, dass BTS-haltige Lösungen die Gärungshemmung von Glycerinaldehyd aufheben. Über die Spezifität dieser Methode habe ich keine Literatur gefunden. (Empfindlichkeit 0.001 mg).

#### D. Direkte Oxydation der $\alpha$ -Ketosäuren.

Methoden, die auf der direkten Oxydation der BTS mittels verschiedenster Oxydationsmittel beruhen, sind schon oft angegeben worden (u. a. BEILSTEIN und WIEGAND, 1884; FERNBACH und SCHOEN, 1914; HOLLEMANN, 1904; QUASTEL, 1924; LEVENE und MEYER, 1914; MAZÉ und RUOT, 1916; BLEYER und BRAUN, 1927).<sup>1</sup> — Bei den meisten dieser Verfahren entsteht hierbei aus der BTS Essigsäure und Kohlensäure; da aber diese in biologischen Substraten auch aus vielen anderen Substanzen entstehen, kommen derartige Methoden nicht für quantitative Bestimmungen in Frage.

Von FROMAGEOT und DESNUELLE wurde jüest (1935) ein sehr empfindliches Verfahren zur Bestimmung von  $\alpha$ -Ketosäuren angegeben. Hierbei werden die  $\alpha$ -Ketosäuren durch  $Ce \cdots$  zu der nächst niedrigeren Fettsäure oxydiert und das überschüssige  $Ce \cdots$  wird titrimetrisch ermittelt. Diese Reaktion soll nach den Forschern für  $\alpha$ -Ketosäuren spezifisch sein, insbesondere sollen Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Methylalkohol, Äthylalkohol, Propylalkohol, Glycerin, Zucker, Glycocoll und Alanin nicht mit Cerisulfat reagieren. Dagegen kann die Anwesenheit von MS zu wesentlichen Fehlern Anlass geben, wenn die MS-Konzentration 5-mal grösser ist als die der BTS.

FROMAGEOT und DESNUELLE verwendeten diese Methode zu BTS-Bestimmungen in Gäransätzen und erhielten gute Resultate. Ich habe diese Methode, die ja äusserst einfach und schnell ist, auf ihre Anwendbarkeit für Harnbestimmungen geprüft. Es sei daher kurz einiges darüber berichtet.

In der Originalmethode wird zu der eiweissfreien, mit Schwefelsäure angesäuerten Analyse ein Überschuss gesättigter oder 10-fach verdünnter Cerisulfatlösung (in 1-n  $H_2SO_4$ ) gegeben und nach ca. 15 Minuten mit genauer Ammoniumferrosulfatlösung (Mohr'sches Salz) gegen Kaliumferricyanid als Indikator bis zur Bildung von Berlinerblau titriert. Die Methode eignet sich noch für die Bestimmung sehr kleiner Mengen von  $\alpha$ -Ketosäuren, nur muss immer gleichzeitig eine Blindprobe ausgeführt werden, da die Cerisulfatlösungen nicht haltbar sind. Auch die Ferroammoniumsulfatlösung muss täglich mit Kaliumpermanganat geprüft werden.

<sup>1</sup> referiert nach WENDEL, 1931—32.

Da der Umschlagspunkt bei der Titrierung mit Mohr'scher Salzlösung von grün zu Berlinerblau ungenau ist und die Lösung immer neu titriert werden muss, habe ich das überschüssige Cerisulfat lieber jodometrisch ermittelt. Hierbei wird ein Überschuss an Kaliumjodid zugesetzt und mit Natriumthiosulfat das frei gewordene Jod auf gewöhnliche Art titriert. Dies ist auch deswegen vorteilhafter, weil die Thiosulfatlösung haltbarer ist.

Diese Methode habe ich in meiner Arbeit sehr oft zur genauen Titrierung von BTS und KGS-Lösungen verwendet. Hier seien einige Werte angegeben, die bei Untersuchung reiner und frischer BTS-Lösungen erhalten wurden (zubereitet aus bestem Natriumpyruvat, Hoffmann—La Roche). (vgl. Tab. 2.)

Tabelle Nr. 2.

*BTS-Bestimmungen in reinen Lösungen mit der Cerisulfatmethode und jodometrischer Titrierung.*

Zugesetzt mg	Gefunden mg	Fehler %
0.5	0.51	+ 2.0
	0.51	+ 2.0
1.0	1.01	+ 1.0
	1.03	+ 2.5
2.5	2.49	— 0.5
	2.50	0
3.0	3.03	+ 1.0
	3.00	0
4.0	4.00	0
	6.0	+ 0.2
	5.96	— 0.4

Für KGS können derartige Bestimmungen nicht angeführt werden, da die synthetische KGS, die mir zur Verfügung stand nur ca. 80 % war.

Um die Anwendbarkeit dieser Methode für Harnbestimmungen festzustellen, wurden ausser den von FROMAGEOT und DESNUELLE untersuchten Verbindungen noch einige normale Harnsubstanzen auf ihr Verhalten gegenüber Cerisulfat untersucht. Für Titrierungen im Harn reichen 1.0—2.0 cm<sup>3</sup>, daher wurden die zu kontrollierenden Stoffe in Mengen, die in dieser Harnquantität vorkommen können, geprüft (vgl. Tabelle 3).<sup>1</sup>

Aus der Tabelle 3 geht hervor, dass praktisch genommen Aceton (200 mg %) Kreatinin (100 mg %), Harnstoff (500 mg %) und Glukose (200 mg %) Cerisulfat nicht reduzieren, wenn man kleine Titrierungsfehler unberücksichtigt lässt. Oxalsäure (100 mg %) und Harnsäure (50 mg %)

<sup>1</sup> In Zusammenarbeit mit MAIJALA und MUIJUNEN (1937).

Tabelle Nr. 3.

Versuche über die Spezifität der Cerisulfatmethode.

Geprüfte Substanz in mg	Thiosulfatverbrauch (0.02-n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Differenz mit der Blindprobe.) in $\text{cm}^3$	Gefundene Menge berechnet als BTS in mg	Fehler in %
Aceton ..... 2.0	0.00	0.00	0
„ ..... 4.0	0.03	0.03	+ 0.6
„ ..... 8.0	0.00	0.00	0
Kreatinin .... 1.0	0.01	0.01	+ 1.0
„ ..... 2.0	0.09	0.08	+ 4.0
„ ..... 4.0	0.03	0.03	+ 0.6
Harnstoff .... 5.0	0.00	0.00	0
„ .....10.0	0.01	0.01	+ 0.1
„ .....15.0	0.02	0.02	+ 0.1
Glukose ..... 2.0	0.03	0.03	+ 1.3
„ ..... 4.0	0.01	0.01	+ 0.3
„ ..... 8.0	0.00	0.00	0
Milchsäure .... 1.22	0.00	0.00	0
„ ..... 2.44	0.03	0.03	+ 1.0
„ ..... 3.66	0.03	0.03	+ 0.7
„ ..... 6.10	0.00	0.00	0
„ ..... 9.76	0.01	0.01	+ 0.1
„ .....12.20	0.00	0.00	0
„ .....15.86	0.02	0.02	+ 0.1
Oxalsäure ..... 1.0	0.67	0.59	+ 59.0
„ ..... 2.0	1.47	1.29	+ 64.5
„ ..... 4.0	2.98	2.62	+ 65.5
Harnsäure .... 0.5	0.19	0.17	+ 34.0
„ ..... 1.0	0.36	0.32	+ 32.0
„ ..... 2.0	0.76	0.67	+ 33.5

dagegen stören schon in normalen Konzentrationen erheblich. Die Oxalsäure gibt in den in Frage kommenden Mengen Anlass zu ca. 65 % zu hohen Werten, die Harnsäure zu ca. 34 % Fehler. Was die Reaktion der MS anbetrifft, konnte in den hier geprüften Quantitäten kein beachtenswerter Cerisulfatverbrauch konstatiert werden. FROMAGEOT und DESNUELLE fanden bei MS-Konzentrationen von 13.5—135 mg 10—64 % zu hohe Werte. Bei dem verhältnismässig geringen MS-Gehalt des Harns dürfte die MS jedoch kaum stören.

Wie aus den angeführten Versuchen hervorgeht, kommt diese Methode wenigstens nicht in dieser einfachen Form für Harnbestimmungen in

Frage. Man kann die Harnsäure des Harns leicht quantitativ durch Uranylacetat-Ammoniumsulfat Reagenz entfernen, wonach man im normaler Harn ca. 30 mg % kleinere Werte findet. Es scheint wahrscheinlich, dass man die Oxalsäure auch quantitativ als Calciumoxalat entfernen kann, aber selbst dann sind die erhaltenen Werte noch so gross, dass sie wohl kaum nur durch  $\alpha$ -Ketosäuren bedingt sein können. Es wäre daher erforderlich noch eine ganze Reihe anderer Harnsubstanzen auf ihre Reaktion mit Cerisulfat zu prüfen (z. B. Glucuronsäurederivate, Schwefelsäureester usw.) — Aus den angeführten Gründen kam diese Methode daher für meine Arbeit nicht in Frage, besonders da es beabsichtigt war die BTS und KGS getrennt zu bestimmen.

## 2. Bestimmung der $\alpha$ -Ketoglutarsäure.

Farbreaktionen zum qualitativen oder quantitativen Nachweis der KGS in wässrigen Lösungen sind bisher noch nicht beschrieben worden. — In früheren Experimenten benutzte man, wie schon erwähnt wurde, zum Nachweis der KGS deren Isolierung als 2.4-Dinitrophenylhydrazon. Das Hydrazon wurde dann durch sein Verhalten verdünnten alkalischen Lösungen gegenüber (leicht löslich in 5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung mit orange-gelber Farbe), Schmelzpunktbestimmung ( $222\text{—}224^\circ$ ) und Mikroverbrennungsanalyse identifiziert.

Zur Isolierung und Reinigung des 2.4-Dinitrophenylhydrazons der KGS aus dem Harn wird in diesem Laboratorium seit 1934 die von SIMOLA vorgeschriebene Methodik benutzt:

1. Der Harn wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, worauf ein Fünftel Volumen heisses Hydrazinreagenz zugesetzt wird (1 % 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung in 2-n HCl, vor Gebrauch frisch zubereitet durch Erhitzen).
2. Nach 1 Minute wird die entstandene Fällung mit einer Nutsche scharf abgesaugt.
3. Mehrmaliges Waschen der Fällung mit 0.5-n HCl.
4. Mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser.
5. Lösung der Fällung in ein kleines Volumen Soda-Lösung (5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
6. Vorsichtiges Ausfällen des Hydrazons mit 2-n HCl.
7. Scharfes Abzentrifugieren der gelben Fällung.
8. Abgiessen der überstehenden Sodalösung, wonach die Fällung 2 mal mit 0.5-n HCl und 2—3 mal mit aqua dest. gewaschen und die Fällung jedesmal durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt wird. Beim zweiten oder dritten Waschen mit Wasser löst sich meist schon etwas Hydrazon, sodass die Waschflüssigkeit stark gelb gefärbt wird.
9. Wiederholung von 5, 6, 7 und 8 wenigstens zweimal.
10. Lösung des Rückstandes in ein kleines Volumen Äthylacetat und Auskristallisieren des Hydrazons (gelbe Nadelbüschel).

Als schnell ausführbare, orientierende Probe auf den Gehalt des Harns an  $\alpha$ -Ketosäuren, speziell KGS, ist von SIMOLA die Bestimmung der Ausfällungsdauer des Hydrazons in Sekunden benutzt worden. Normaler Harn gibt mit der heissen Hydrazinreagenz im Verlauf von 1 Minute keine Fällung und verbleibt meistens auch ganz klar; nur ab und zu wird eine

leichte Trübung rotbrauner Farbe beobachtet, die nicht durch Carbonylhydrazoue hervorgerufen wird. Harn mit reichlichem KGS-Gehalt trübt sich meist augenblicklich, in wenigen Sekunden, und kurze Zeit später (10—40 Sekunden) entsteht eine starke gelbe Fällung, sodass der Harn völlig undurchsichtig wird. In diesem Laboratorium wird immer mit der Stoppuhr der Zeitpunkt der ersten leichten Trübung und der Augenblick, in dem die Probe undurchsichtig wird, bestimmt. Falls nicht innerhalb von einer Minute eine deutliche gelbe Fällung auftritt ist die Probe negativ. Die Ausführung dieser Probe geschieht genau, wie bei der Isolierung des Hydrazons: 1 cm<sup>3</sup> Harn wird mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und dazu gibt man 0.4 cm<sup>3</sup> der heissen Hydrazinreagenz.

KRENS (1937) gibt im Zusammenhang mit seiner Modifikation der Methode von SZENT-GYÖRGYI und GÖSZY (1935) zur Bestimmung der Bernsteinsäure an, dass durch vorhergehende Behandlung mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung u. a. aus KGS Bernsteinsäure entstehen könne. — Auf Vorschlag von SIMOLA habe ich mich im Herbst 1937 mit der Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung der KGS nach Oxydation zu Bernsteinsäure befasst. Gegen Ende 1937 gelangte ich schliesslich zu positivem Resultat<sup>1</sup> und konnte die ersten quantitativen Bestimmungen vornehmen (vgl. SIMOLA, 1937, 1938; SIMOLA und KRUSIUS 1938).

Ungefähr gleichzeitig oder etwas früher hatte KRENS (1938) eine quantitative Mikromethode zur Bestimmung der KGS ausgearbeitet, die mit der in diesem Laboratorium verwendeten in den Hauptzügen übereinstimmte, nur mit dem Unterschied, dass die Bernsteinsäure biologisch bestimmt wurde, wodurch die Methode empfindlicher aber vielleicht auch weniger spezifisch wurde.

Da in meiner Arbeit nur die in diesem Laboratorium ausgearbeitete Methode verwendet wurde, soll sie zuerst erklärt werden. Das Prinzip ist folgendes: Die  $\alpha$ -Ketosäuren werden zu 2.4-Dinitrophenylhydrazonen umgesetzt, mit Äther oder Äthylacetat extrahiert, der Äther verdampft und der Rückstand in Lauge gelöst und mit Schwefelsäure und Kaliumpermanganat gründlich oxydiert, wobei das übersehüssige Hydrazin und alle Hydrazone mit Ausnahme der KGS völlig oxydiert werden. Aus dem Hydrazon der KGS entsteht Bernsteinsäure, die in wasserfreies Natriumsulfat aufgenommen und mit Äther extrahiert wird. Die endgültige Bestimmung der Bernsteinsäure erfolgt als Silbersalz durch Wägen.

<sup>1</sup> Über diese Methode wurde eine vorläufige Mitteilung gegeben, vide Krusius, 1938. (23. Februar 1938). Diese und die anderen von mir verwendeten Methoden wurden übrigens schon 1938 MYRÄCK und CARLSTRÖM zur Verfügung gestellt, welche sich ihrer in der Folge bei Untersuchungen über B-Vitaminmangelzustände bedienten. Eine referierende Zusammenfassung derselben wurde bereits von LARSSON und MYRÄCK (1939) in schwedischer Sprache publiziert.

Der genauere Verlauf der Bestimmung ist folgender:

1. *Enteiweissung* bzw. *Entfernung* bei der Extraktion störender Substanzen. Im Allgemeinen wird der Harn vorteilhafter Weise mit ungefähr dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, besonders wenn er sehr konzentriert ist. (Die Verdünnung kann ausbleiben, wenn man mit grossen Mengen normalen Harn arbeitet.) — Alle biologischen Substrate müssen, unabhängig von der Tatsache, ob sie Eiweiss enthalten oder nicht, mit Natriumwolframat (10 %) und Schwefelsäure (50 vol. %) versetzt werden zur Entfernung von Stoffen, die bei der Extraktion mit Äther zur Schaumbildung Anlass geben und so eine genaue Trennung der wässrigen Phase von der überstehenden Ätherschicht unmöglich machen. Die Ausfällung mit Wolframsäure muss sehr sorgfältig ausgeführt werden, da man sonst keine guten Ergebnisse erhält. — Zu je 10 cm<sup>3</sup> Harn werden am vorteilhaftesten 1 cm<sup>3</sup> Natriumwolframatlösung gegeben und dann unter andauerndem Umschütteln tropfenweise 1 cm<sup>3</sup> der Schwefelsäure. Falls die Verdünnung mit Wasser vorgenommen wird enthält die Analyse dann ca. 2.5 % Schwefelsäure. Nach der Ausfällung lässt man den Harn am besten wenigstens 2 Stunden stehen (bei Bedarf auch über Nacht im Eisschrank) und filtriert dann quantitativ durch ein mittleres Filter. Beim Nachspülen mit Wasser wird das Filtrat meist wieder etwas trüb, in dem sich wieder eine leichte Wolframatfällung bildet. Man setzt nun die Analysen kürzere Zeit auf ein kochendes Wasserbad (10—20 Minuten) bis die Lösung dunkelbraun wird oder sich wieder trübt. Danach wird sofort in Eiswasser abgekühlt, wobei sich immer, heinahe sofort, eine ziemlich starke Fällung bildet. Nach einiger Zeit wird dann von neuem quantitativ filtriert (ev. durch dasselbe Filter). So vorbereitete Harn-, Blut- oder Gewebsextraktanalysen schäumen nie bei der Extraktion.

### 2. *Ausfällung der 2.4-Dinitrophenylhydrazone.*

Zu dem klaren Filtrat wird nun heisse, frisch zubereitete Hydrazinreagenz hinzugegeben. Zur vollständiger Umsetzung der  $\alpha$ -Ketosauren zu Hydrazonen muss ein deutlicher Überschuss an Hydrazin verwendet werden. Bei Harn, in dem die orientierende Hydrazinprobe (Bestimmung der Ausfällungsdauer) negativ ist, reicht 1 cm<sup>3</sup> Hydrazinreagenz auf 10 cm<sup>3</sup> Harn. Ist die Hydrazinprobe stark positiv, muss man mehr verwenden (bis zu 1 cm Reagenz auf 2.5 cm<sup>3</sup> Harn); bei mittleren Ausfällungszeiten (20"—40") reicht ein Fünftel Volumen Hydrazin pro Harnmenge. — Bei ausreichender Ausfällung soll nach der Ätherextraktion die wässrige Phase noch hydrazinfarben (gelb-rotbraun) sein. Ist dies nicht der Fall, muss nach Wegdunsten des in dem Harn gelösten Äthers von neuem mit Hydrazin ausgefällt werden.

### 3. *Extraktion der Hydrazone.*

Nach dem Hinzufügen der Hydrazinreagenz sollen die Analysen mehrere Stunden stehen. Praktisch ist es die Proben über Nacht im Eisschrank aufzubewahren, aber auch schon nach 2 Stunden dürfte die Hydrazon-

bildung vollständig sein. — Die Proben werden nun mit Schwefelsäure 5 vol % gemacht. (Am einfachsten misst man das Gesamtvolumen im Massglas und berechnet die  $H_2SO_4$ -Menge, die hinzugefügt werden muss, um die Lösung 5 % zu machen.)

Hiernach wird in einem Scheidetrichter 3 mal mit einem Fünftel Volumen Äthylacetat oder peroxydfreiem Äther extrahiert. Jedesmal sollte ca. 1—2 Minuten kräftig geschüttelt werden. Die Essigester- bzw. Ätherschichten werden in einer Erlenmeyerflasche mit weitem Hals (300—400  $cm^3$ ) gesammelt. Zuletzt soll der Scheidetrichter noch mit dem Extraktionsmittel ausgespült werden. — Bei sehr kleinem Volumen der Harnanalyse und reichlichem Hydrazongehalt muss die erste Extraktion mit etwas grösserem Volumen ausgeführt werden (ca.  $\frac{1}{3}$  Vol.), da ein Teil des Äthers sich in der Wasserschicht löst. Ursprünglich verwendete ich immer Äthylacetat zur Extraktion. Dieses nimmt nicht nur alle Hydrazone, sondern auch das überschüssige Hydrazin sehr leicht auf. KREBS verwendet peroxydfreien Äther, in dem sich die Hydrazone beinahe ebenso leicht lösen, das Hydrazin aber nur schlecht. Da es vorteilhaft ist, so wenig wie möglich Hydrazin zu extrahieren, habe ich später immer Äther verwendet, der auch leichter wegzudunsten ist. — Der Äther muss peroxydfrei sein (Narkoseäther), um eine vorzeitige Oxydation der Hydrazone zu vermeiden.

Nach der Extraktion wird die Ätherphase eingedunstet. Am vorteilhaftesten verdunstet man den Äther auf dem Wasserbade unter Einleitung eines Stickstoff- oder Kohlensäurestroms, wodurch die Entzündung des Äthers, selbst bei Kochen des Wasserbades, verhindert und die Verdunstung beschleunigt wird. (Der Gasstrom wird durch ein Glasrohr in den Äther eingeleitet; für jede Analyse muss ein eigenes Glasrohr verwendet werden, da ein Teil des Hydrazons an dem Rohr heften bleibt und später sorgfältig abgelöst werden muss.) — Nach Eindunsten des Äthers kann man den Rückstand unbegrenzte Zeit in dieser trockenen Form aufbewahren bis man eine grössere Anzahl von Analysen hat, die dann vorteilhaft gleichzeitig weiter verarbeitet werden.

#### 4. Oxydation der Hydrazone.

Im weiteren Verlauf wird das Hydrazin-Hydrazongemisch in NaOH gelöst; gewöhnlich reichen 20—30  $cm^3$  der 2-n Lösung (sorgfältiges Abspülen des Glasrohrs!) Hiernach wird unter Eiskühlung vorsichtig mit der berechneten Menge Schwefelsäure (10-n) neutralisiert (tropfenweise zusetzen, unter fortgesetztem Schwenken der Erlenmeyerflasche). Beim Neutralisieren schlägt die tief rotbraune Farbe des Hydrazongemischs in gelb um. Hiernach wird noch soviel Schwefelsäure hinzugefügt, dass die Lösung wieder 5 vol % wird. Nun wird allmählich Kaliumpermanganat in Substanz zugesetzt unter fortwährendem Umschwenken. Man setzt so lange Permanganat hinzu bis die tief violette Farbe nicht mehr verschwindet. Es ist vorteilhaft einen Überschuss an Permanganat zu benutzen, da sonst das Hydrazin nicht völlig oxydiert wird. Setzt man oft



Kaliumpermanganat zu, und schüttelt man die Lösung häufig, ist die Oxydation oft schon in kurzer Zeit beendet. Es hat sich aber als vorteilhaft erwiesen das Oxydationsgemisch mit einem geringen Überschuss an Permanganat bis zum folgenden Morgen bei Zimmertemperatur stehen zu lassen. Wenn dann die violette Permanganatfarbe noch deutlich vorhanden ist, kann man die Oxydation als beendet ansehen.

Ein starker Überschuss von Kaliumpermanganat kann mit Wasserstoffsperoxyd unter vorsichtiger tropfenweiser Zugabe einer stark verdünnten Lösung entfernt werden. Nach der quantitativen Filtrierung zur Entfernung des gebildeten Braunsteins soll das Filtrat ganz farblos oder, noch günstiger, unbedeutend hell-rosa sein. Ist das Filtrat noch gelb, muss die Oxydation fortgesetzt werden. Statt dem quantitativen Filtrieren kann man natürlich auch auf ein bestimmtes Volumen auffüllen und einen aliquoten Teil des Filtrats benutzen.

##### 5. Bestimmung der Bernsteinsäure.<sup>1</sup>

Das Filtrat wird nun in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zu einigen cm<sup>3</sup> Volumen eingengt, in wasserfreies Natriumsulfat aufgenommen und sorgfältig verrieben. Das Sulfat wird im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet und erneut verrieben. Hiernach füllt man das Sulfat quantitativ in Extraktionshülsen und extrahiert die Bernsteinsäure ca. 24 Stunden im Soxhletapparat mit gewöhnlichem Äther (getrocknet mit wasserfreiem Natriumsulfat). Dann wird der Äther abgedunstet und der Rückstand auf dem Wasserbade in ein kleines Volumen heisses Wasser (10 cm<sup>3</sup>) gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wird mit Bariumhydroxydlösung gegen Phenolphthalein bis zur Rotfärbung neutralisiert. Hierbei fällt sich eventuell in den Äther übergegangenes Sulfat oder Phosphat sowie Spuren von Hydrazin als Bariumsalz aus. Man filtriert durch ein kleines angefeuchtetes Filter, spült mit einigen cm<sup>3</sup> Wasser nach und wiederholt die Lösungsprozedur auf dem Wasserbade (mit ca. 5 cm<sup>3</sup> aqua). Nach dem auch diese Lösung abgekühlt und nach Zusatz von 1—2 Tropfen Bariumhydroxydlösung wieder rot geworden ist, wird zu der ersten Lösung filtriert und mit Wasser nachgespült. — Bei dieser Lösungsprozedur muss man sich bemühen kein zu grosses Volumen zu erhalten (20 cm<sup>3</sup> genügt). Die völlig klare, rote Lösung wird dann mit stark verdünnter HNO<sub>3</sub> (1/100-n) vorsichtig bis zum Verschwinden der roten Farbe angesäuert. Hiernach gibt man einen Überschuss 10 % Silbernitratlösung (1—4 cm<sup>3</sup>) hinzu, wonach sich die Bernsteinsäure als schöne weisse Fällung ausfällt, falls in der Analyse grössere Mengen KGS vorhanden sind. Die Silbernitratfällung soll ca. 4 Stunden im Dunkeln stehen. In dieser Zeit wird die gesamte Bernsteinsäure quantitativ ausgefällt. — Hiernach wird die Fällung abgesaugt in ein gewogenes Glassinter (G 4), mit verdünnter Ammoniumnitratlösung und dann mit Wasser gewaschen. Dann wird die Fällung im Wärmeschrank (ca. 100°) getrocknet und gravimetrisch bestimmt.

<sup>1</sup> Die Bernsteinsäurebestimmung ist eine in diesem Laboratorium verwendete Modifikation der Methoden von u. a. MOYLE (1924), HAHN und HAARMANN (1929) u. ELLIOT und GREIG (1937).

### 6. Berechnung des KGS-Gehalts.

Zur Berechnung des KGS-Gehalts der Analyse wird das erhaltene Gewicht des Silbersalzes der Bernsteinsäure ( $\text{Ag-OOC-H}_2\text{C-C H}_2\text{-COO-Ag}$ ; Mol. Gew. 331.79) mit dem Koeffizienten 0.44 multipliziert. (100 mg bernsteinsaures Silber entspricht 35.594 mg Bernsteinsäure und 44.033 mg  $\alpha$ -Ketoglutar säure).

### 7. Erforderliche Reagenzien.

10 % Natrium-Wolframatlösung (Natrium Wolframicum pro analysis).

50 vol. %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Acidum sulfuricum pro analysis, D-1.84).

2.4-Dinitrophenylhydrazinreagenz (1 % Lösung in 10 vol. %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in der Hitze gelöst, frisch vor Gebrauch zubereitet).

Peroxydfreier Äther (Aether ad narcosim) bzw. Äthylacetat (Essigsäure-äthylester).

2-n NaOH-Lösung (Natrium hydricum oxydatum in rotulis pro analysis).

10-n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (eingestellt auf die 2-n Lauge).

Kaliumpermanganat in Substanz und als z. B. 2 % Lösung (pro analysis).

3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung, die bei Bedarf ca. 5-mal verdünnt wird. (Hydrogenum peroxyd.).

Wasserfreies Natriumsulfat (Natrium sulfuricum anhydricum pro analysis).

Äther (Laboratoriumsäther, getrocknet mit wasserfreiem Natriumsulfat).

1/100-n  $\text{Ba (OH)}_2$ -Lösung (Aufbewahrung unter Luftabschluss).

1/100-n  $\text{HNO}_3$ -Lösung.

10 % filtrierte  $\text{AgNO}_3$ -Lösung (Im Dunkeln aufbewahren, Argent. nitric. pro analys.).

0.5 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung.

1 % alkoholische Phenolphthalein-Lösung.

### 8. Empfindlichkeit der Methode.

Im Folgenden seien die Ergebnisse einiger mit wässrigen Lösungen von KGS ausgeführten Bestimmungen wiedergegeben (vgl. Tabelle 4). Der Gehalt der Lösungen wurde mit der Cerisulfatmethode genau titriert. Im Allgemeinen waren die KGS-Präparate ca. 80 %.

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, bekommt man mit dieser Methode in reinen KGS-Lösungen eine zufriedenstellende Ausbeute. Die Fehlermöglichkeiten in einer so langen und umständlichen Methode sind natürlich verhältnismässig gross, jedoch schwanken die Paralellbestimmungen nur bei kleineren Mengen KGS stärker. Hat man in der Analyse annähernd 5 mg KGS, ist die Methode recht brauchbar.

Im normalen Harn sind nur ganz geringe Mengen KGS vorhanden, meist zwischen 2—10 mg %. Da die Bestimmung gravimetrisch ist, erhält man natürlich beim Wägen sehr kleiner Mengen verhältnismässig

Tabelle Nr. 4.  
KGS-Bestimmungen in reinen Lösungen.

Zugesetzt mg KGS	Gefunden mg KGS	Ausbeute %
36.00	34.56	96.0
36.00	33.69	93.5
30.00	29.16	97.5
24.25	23.65	98.0
24.25	23.21	95.7
24.07	24.46	101.5
24.07	22.55	93.7
15.00	14.62	97.5
15.00	13.08	87.2
12.03	11.41	94.8
12.03	10.17	84.5
7.20	6.52	90.6
7.20	6.16	85.5
4.81	5.01	104.1
4.81	3.70	77.1 (?)

grosse Fehler. Man soll daher immer zu Harnquantitäten streben, die ca. 10 mg oder mehr bernsteinsaures Silbersalz liefern (Minimum ca. 5 mg). Bei Bestimmungen mit normalem Harn muss man daher mehr als 50 cm<sup>3</sup> zur Bestimmung verwenden (optimal 100—200 cm<sup>3</sup>). Bei Harnen mit stark positiver Hydrazonprobe genügen meist 10—20 cm, oft schon 5 cm<sup>3</sup>.

Trotzdem gelingt es im normalen Harn, selbst bei Verwendung grösserer Mengen (mehr als 100 cm<sup>3</sup>) selten völlig weisse oder schwach gelbe Silbersalzfällungen zu erhalten, wie es bei Vermehrung der KGS im Harn der Fall ist. Die Fällung ist nach dem Trocknen dann meist hell bis dunkelbraun, welches einerseits durch Spuren von Hydrazin, andererseits durch Reduktion des Silbernitrats bedingt sein mag.

Es ist daher festzustellen, dass die Methode zur Bestimmung der KGS in kleinen Mengen normalen Harns nicht ganz exakt ist, in dem die Fehlerbreite verhältnismässig gross ist. Dies kann dadurch umgangen werden, dass man grössere Portionen des Normalharns verwendet. Da bei Tierexperimenten oft nur kleine Harnmengen zur Verfügung stehen, muss man bei Analysen mit negativer Hydrazinprobe, den Harn von mehreren Tagen verwenden. Dies ist möglich, indem man den Rückstand der Ätherextraktion nach Abdunsten des Äthers aufbewahrt und die Rückstände mehrerer Tage kombiniert, ehe man zur Oxydation des Gemischs schreitet.

Tabelle Nr. 5.

Zusatz von KGS zum normalen Urin.

Harnmenge in cm <sup>3</sup>	Gefunden im Harn mg KGS <sup>1</sup>	Zugesetzt zum Harn mg KGS	Ausbeute an KGS		
			Gefunden mg KGS	Berechnet mg KGS	%
100	6.10	11.63	17.61	17.76	99.1
100	6.57	3.89	11.17	10.46	106.7
100	1.76	3.94	4.58	5.70	80.4
20	0.55	4.93	5.07	5.48	92.5
20	0.55	9.86	9.56	10.41	91.8
20	0.55	9.86	9.78	10.41	93.9
20	0.55	14.80	15.21	15.35	99.8
20	0.55	14.80	15.81	15.35	102.9

<sup>1</sup> Mittelwert aus zwei Kontrollbestimmungen.

Bei Zusatz von KGS zu normalem Harn erhält man ungefähr dieselbe Ausbeute wie in reinen KGS-Lösungen (vgl. Tabelle Nr. 5).

Wie aus der Tabelle Nr. 5 hervorgeht erhält man eine zufriedenstellende Ausbeute im Harn nach Zusatz von KGS. Der Fehlerprozent dürfte hier hauptsächlich durch den Nullwert des Harns bedingt sein und nicht dadurch, dass ein Teil der zugesetzten KGS verloren geht.

Zur Vermeidung der gravimetrischen Bestimmung der Bernsteinsäure kann man auch mit einer Silbernitratstandartlösung ausfällen und das verbrauchte Silbernitrat titrimetrisch bestimmen.<sup>1</sup>

Die von KREBS publizierte Methode ist im Prinzip genau dieselbe wie das hier beschriebene Verfahren. Der hauptsächlichste Unterschied besteht darin, dass die aus der KGS gewonnene Bernsteinsäure biologisch bestimmt wird. Hierzu verwendet KREBS eine von ihm ausgearbeitete Methode (1937) zur Bestimmung der Bernsteinsäure, bei der diese in Gegenwart von Succinodehydrogenase oxydiert und der Sauerstoffverbrauch in der Warburg-Apparatur manometrisch bestimmt wird.<sup>2</sup>

Nach den Angaben von KREBS soll diese biologische Methode sehr spezifisch sein; ausser Bernsteinsäure sollen durch die Succino-Dehydrogenase nur Methylbersteinsäure, d-Glutaminsäure und  $\alpha$ -Glycerophosphorsäure angegriffen werden. Für Harnbestimmungen ist die Methode jedoch früher noch nicht verwendet worden und müsste daher die Spezifität eventuell auch noch in Bezug auf einige Harnsubstanzen geprüft werden.

Mittels der Dehydrierung kann man im Warburgapparat nach KREBS noch 0.2 mg Bernsteinsäure bestimmen. Gemäss diesen Angaben ist diese

<sup>1</sup> Die titrimetrische Bestimmung der Bernsteinsäure wurde in dieser Arbeit nur versuchsweise verwendet.

<sup>2</sup> Modifikation der Methode von SZENT-GYÖRGYI und GÖSZY (1935).

Methode also empfindlicher als das hier angegebene Verfahren. Trotz dieser Genauigkeit verwendet KREBS zu seinen Bestimmungen im normalen Menschenharn 100 cm<sup>3</sup>; diese Harnmenge reicht aber auch schon zur gravimetrischen Bestimmung der Bernsteinsäure.

Ein Nachteil der manometrischen Bestimmung dürfte sein, dass man hierzu immer frische Succinodehydrogenasepräparate braucht, die aus Tauben-Brustmuskel oder Hühnerherz hergestellt werden und nur 4 Tage lang Verwendung finden sollten.

#### 9. Spezifität der KGS-Bestimmung durch Überführung in Bernsteinsäure.

KREBS (1938) hat eine ganze Reihe von Verbindungen in Bezug auf ihre Oxydierbarkeit durch Kaliumpermanganat untersucht und gefunden, dass ausser aus KGS auch aus  $\alpha$ -Hydroxyglutarsäure beinahe quantitativ Bernsteinsäure entsteht. Ferner wurde aus Glutaminsäure, Arginin und Ornitin durch Behandlung mit Permanganat ein geringer Prozentsatz Bernsteinsäure gebildet.

Ausser diesen Bernsteinsäure bildenden Verbindungen kann natürlich auch die Bernsteinsäure selbst bei der KGS-Bestimmung stören.

Bei Extraktion des Urins (verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser) mit nur einem Fünftel Volumen Äther sind diese Substanzen aber beinahe völlig unlöslich in Äther. Auch die freie KGS und BTS oder deren Salze werden kaum in die Ätherschicht aufgenommen, dagegen sind die Hydrazone dieser Säuren stark löslich in Äther, während ihr Löslichkeitsprozent in Wasser minimal ist.

Beachtet man ferner die Tatsache, dass der Harn nur ganz geringe Mengen von Bernsteinsäure oder Bernsteinsäure bildenden Verbindungen enthält, wie aus Kontrollbestimmungen hervorgegangen ist, kann man ohne weiteres sagen, dass die bei gewöhnlichen Harnbestimmungen nach der Oxydation mit Permanganat gefundene Bernsteinsäure nur von der KGS her stammt.

Fehler könnten nur dann eintreten, wenn in der Analyse kaum KGS, dagegen aber sehr grosse Mengen Bernsteinsäure oder Ornitin, Arginin bzw. Glutaminsäure vorhanden wären. Deswegen hat KREBS eine Kontrollbestimmung vorgeschlagen, bei der mit Äther extrahiert wird ohne vorhergehende Ausfällung mit der Hydrazinreagenz. Der bei Kontrollbestimmung erhaltene Wert ist dann von dem gefundenen KGS-Gehalt abzuziehen. — Bei zahlreichen derartigen Kontrollbestimmungen fand KREBS aber immer nur minimale Bernsteinsäuremengen, die vernachlässigt werden konnten. — In diesem Laboratorium wurden ebenfalls bei Harnbestimmungen derartige Kontrollen ausgeführt, es wurden aber in dem Ätherauszug nie deutlich nachweisbare Bernsteinsäuremengen gefunden.

#### 10. Gleichzeitige Bestimmung der Bernsteinsäure und aller Bernsteinsäurebildenden Verbindungen neben der KGS.

Zur Bestimmung der Bernsteinsäure und anderer Verbindungen, die bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat Bernsteinsäure bilden (\*Ge-

samtbernsteinsäure<sup>\*)</sup> wurde die wässrige Schicht nach der Ätherextraktion der Carbonylhydrazone auf dem Wasserbade bis zu kleinem Volumen eingedunstet. Hierbei muss soviel NaOH zugesetzt werden, dass die überschüssige Schwefelsäure neutralisiert wird, jedoch soll die Lösung dauernd deutlich sauer reagieren (Kongopapier: blau). Danach wird die eingeeengte Flüssigkeit in wasserfreies Natriumsulfat aufgenommen und verrieben, im Exsiccator getrocknet und 24 Stunden im Soxhletapparat extrahiert. Nach Abdunsten des Äthers wird der Rückstand in 5 % Schwefelsäure gelöst und in der Hitze mit Kaliumpermanganat oxydiert, bis die Brauneinfällung nicht mehr verschwindet und ein geringer Überschuss an Permanganat vorhanden ist. Dann wird verdünnt mit Wasser, filtriert und wieder zu einigen cm<sup>3</sup> eingeeengt, wonach die Flüssigkeit von neuem in Natriumsulfat aufgenommen und wie das erste Mal mit Äther im Soxhletapparat extrahiert wird. Dann ist die Bernsteinsäure genau wie bei der KGS-Bestimmung zu ermitteln.

### 3. Bestimmung der BTS.

#### 1. Farbreaktionen.

Im Laufe der Zeit sind eine ganze Reihe von Farbreaktionen zum Nachweis der BTS angegeben worden. Hier sollen nur die bekanntesten erwähnt werden.

ALVAREZ (1897) zeigte, dass die BTS mit Naphtolen in konzentrierter Schwefelsäure zu Farbstoffen kondensiert wird; mit  $\alpha$ -Naphtol- $H_2SO_4$  entsteht eine gelbe bis orangene Färbung, mit  $\beta$ -Naphtol- $H_2SO_4$  eine rote Farbe, die beim Erwärmen in blau umschlägt. Heute wird noch viel die Reaktion von SIMON (1897, 1898) und SIMON und PIAUX (1924) zum Nachweis der BTS verwendet. Hierbei bildet sich in Gegenwart von BTS mit denselben Reagenzien, wie bei der Acetessigsäure (bzw. Aceton-) probe von LANGE, ein blauer Ring an der Berührungsstelle des Ammoniaks mit der darunter befindlichen Flüssigkeit. Die Farbe ist am stärksten nach einer Stunde und entsteht in Konzentrationen von 10—100 mg %. — Im Harn wird der blaue Ring bei niedrigem BTS-Ghalt meist durch eine braune Tönung verdeckt. — POSTERNACK (1927) wies die BTS noch in Verdünnungen von 1:5000 mit Phloroglucin und Salzsäure durch Rotfärbung nach. ANDERSON, PETERSON und FRED (1928) zeigten, dass die BTS auch mit Uffelmannscher Reagenz eine Farbe bildet. EEGRIWE (1933) reduzierte die BTS mit Magnesiumpulver zu MS und wies diese durch ihre blaue Fluoreszens mit o-Oxydiphenyl- $H_2SO_4$  nach (Empfindlichkeit bis zu 0.6 mg %).<sup>1</sup> DISCHE und ROBBINS (1934) beschrieben eine Farbreaktion der BTS mit  $\alpha$ -Methylindol und Salzsäure. Noch 0.1 mg % BTS

<sup>1</sup> Neuerdings haben MILLER und MUNTZ (1938) eine Ultramikromethode zur Bestimmung der MS in cariösen Zähnen und in Blutserum unter Verwendung der Farbreaktion von EEGRIWE (1933) ausgearbeitet. Mit dieser Methode werden Mengen von 0.002—0.010 mg MS ermittelt.

geben nach 20 Stunden eine deutliche Rosafärbung, während Methylglyoxal noch in Verdünnungen von  $10^{-7}$  nach 2 Stunden eine violette Farbe bildet. Durch Formaldehyd und Acetaldehyd entsteht mit  $\alpha$ -Methylindol eine weisse Trübung und aromatische Aldehyde rufen eine gelbe bis orange-farbene Trübung hervor. Dioxyaceton, Glycerinaldehyd und Acetol sollen nur eine schwache Färbung hervorrufen und Glukose reagiert überhaupt nicht. — Diese Reaktion ist auch zum quantitativen Nachweis der BTS in Konzentrationen von 0.1—1.0 mg % vorgeschlagen worden. DE JONG und PICCARD (1937) haben neuerdings die  $\alpha$ -Methylindolprobe diesbezüglich geprüft und gefunden, dass die Farbintensität mit der Konzentration der Reagenzien und der Temperatur variiert. Auch soll die Reaktion nicht spezifisch sein. — Ferner sind noch Farbreaktionen von u. a. GARZAROLLI-THURNLACKH<sup>1</sup> (1899) und QUASTEL (1924) beschrieben worden. — Auch mit Veratrol, dem bekannten MS-Reagenz, bildet die BTS, wie ich feststellen konnte, eine rosa Färbung. Diese ist nach 20 Minuten nur ca.  $\frac{1}{4}$  so stark wie die der entsprechenden MS-Menge, dagegen ist die Rotfärbung nach 24 Stunden in Proben von MS und BTS ungefähr gleich stark.

## 2. Quantitative Methoden.

### Die Salicylaldehyd-Methode.

Von STRAUB (1936) wurde die BTS im enteweissten Gewebe mit Salicylaldehyd kolorimetrisch bestimmt. Genau wie Aceton und einige andere Carbonylverbindungen bildet nämlich BTS mit Salicylaldehyd in starker Kaliumhydroxydlösung eine orangegelbe Farbe (o-Dioxybenzal-aceton), die stufenphotometrisch bestimmt werden kann. Für die Bestimmung muss eine empirische Extinktionskurve mit reinen BTS-Lösungen aufgestellt werden, da das Verhältnis zwischen Farbintensität (bzw. Extinktion) und der Konzentration der BTS keine lineare Gerade ist, wie bei den Acetonbestimmungen. — Straubs Methode ist sehr einfach und schnell und kann für Konzentrationen von 0.05—0.67 mg BTS verwendet werden. Leider ist die Reaktion des Acetons mit Salicylaldehyd viel empfindlicher, indem man schon leicht 0.005—0.010 mg bestimmen kann. Bei Bestimmungen der BTS mit dieser Methode müssen daher Aceton und alle eventuell Aceton bildenden Substanzen vorher entfernt werden. Hierüber hat STRAUB keine Angaben gemacht. — Zu Harnbestimmungen eignet sich diese Methode auch aus dem Grunde nicht, weil die orangene Farbe im Harn durch eine in Stärke und Intensität variierende braune Tönung verdeckt wird.

### Methoden, die auf der Reduktion der BTS zu MS beruhen.

Schon 1863 wurde zum qualitativen Nachweis die BTS von WISLIZENUS (1863) und DEBUS (1863) zu MS reduziert. Für quantitative Zwecke wurde diese Reduktion zu MS zum ersten Male von LIEBEN (1923) ver-

<sup>1</sup> Rotfärbung ätherischer Eisenchloridlösungen.

wendet. LIEBEN bestimmte in einigen Gäransätzen grössere Mengen von BTS (ca. 250 mg) durch Reduktion zu MS mit Zinkpulver und Salzsäure (5.0 g Zn und 400 cm<sup>3</sup> 10 % HCl) und bestimmte die MS nach der Methode von FÜRTH-CHARNASS (1910). Die Ausbeute betrug 80—109 % in reinen BTS-Lösungen. Da bei der MS-Bestimmung nach FÜRTH-CHARNASS schon 10—20 % Verlust an MS auftreten, scheint diese Ausbeute erstaunlich gross. Über die Bestimmung von BTS in MS-haltigen Lösungen macht LIEBEN keine näheren Angaben.

LAUFBERGER (1928) und KRISHNA und SREENIVASAYA (1928) fanden, dass die Methode von LIEBEN zur Bestimmung kleinerer BTS-Mengen nicht ausreichend war. Die zuletzt genannten Forscher arbeiteten eine ziemlich umständliche Bestimmungsmethode der BTS aus, wobei diese Säure vor der Reduktion von der MS getrennt wird. Das eiweissfreie Gewebsextrakt wird neutralisiert und im Vakuum bei 50° eingedunstet. Hiernach wird es in konzentrierte Ammoniumsulfatlösung aufgenommen und die Lösung im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert, wobei alle ätherlöslichen Säuren (die meisten Mono- und Dicarbonsäuren) in den Äther übergehen. Das Ätherextrakt wird dann eingedunstet und mit Bisulfit versetzt zum Abfangen der Carbonylverbindungen, und die Bisulfitlösung wird wieder mit Äther extrahiert zur Entfernung der MS. Die MS-freie Flüssigkeit wird nun mit Zink und Schwefelsäure unter Zusatz von etwas Kupfersulfat als Katalysator (50 cm<sup>3</sup> 17.5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g Zn u. 1 gt. gesättigte CuSO<sub>4</sub>-Lösung) zu MS reduziert. Bei der Bestimmung der MS nach der Methode von FRIEDEMANN-COTONIO-SHAFFER (1927) wurde dann eine Ausbeute von ca. 80 % BTS erhalten.

Diese Methode ist ziemlich lang und umständlich. Die zweimalige Ätherextraktion kann leicht zu grösseren Verlusten führen, da die BTS und MS aus Flüssigkeiten mit Äther nur schwer quantitativ zu extrahieren sind. Die Methode dürfte daher zur Bestimmung kleinerer Mengen BTS schwerlich in Frage kommen und kann bei BTS-Bestimmungen in kleinen Harnquantitäten nicht benutzt werden.

COOK (1930) hat eine ziemlich ähnliche Methode zur Bestimmung der BTS beschrieben, wobei zuerst andere flüchtige Carbonylverbindungen durch Destillation entfernt wurden.

FRIEDEMANN und KENDALL (1929) und KENDALL und FRIEDEMANN (1930) haben auch die BTS durch Reduktion bestimmt. 10—60 mg BTS in 75 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit wurden mit 0.5 g Zn und 2.5 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Zusatz von 1 Tropfen 20 % CuSO<sub>4</sub>-Lösung im kochenden Wasserbad zwei Stunden lang reduziert. Bei der MS-Bestimmung nach FRIEDEMANN-COTONIO-SHAFFER wurde eine Ausbeute von 85—94 % BTS erhalten.

Nach diesen Forscher eignet sich ihre Methode zur Bestimmung der BTS in Bakterien-Substraten. Ist gleichzeitig MS vorhanden, wird diese in einer Parallellprobe ohne Zinkreduktion bestimmt. Bei Blutbestimmungen (2.5 cm<sup>3</sup>) fanden die Autoren unter Verwendung verschiedener Methoden zur Fällung des Eiweiss in derselben Blutprobe stark schwankende Werte (2.7—7.0 mg %). Bei Harnbestimmungen waren nur im konzen-



trierten Morgenharn nachweisbare Mengen BTS zu finden (ca. 4 mg %), in dem gewöhnlichen Tagesharn fanden diese Forscher nach der Reduktion aber ein Defizit an »Gesamt-MS« (bis zu 3 mg %). Die Harnbestimmungen wurden mit grossen Harnquantitäten ausgeführt.

Die quantitative Reduktion der BTS zu MS in reinen Pyruvatlösungen ist ferner noch von WENDEL (1931—32) untersucht worden. Nach diesem Forscher erhält man bei Reduktion von BTS (0.5—75 mg, in 23—150 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit) mit Zink-Kupfer und Schwefelsäure (0.5—2.0 g Zn, 2—4 gtl. gesättigtes CuSO<sub>4</sub> und 2—5 cm<sup>3</sup> 5-n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in der Kälte (Reduktionszeit nur 5 Minuten) sehr gute Resultate. Bei Bestimmung der MS nach der Reduktion (Methode von FRIEDEMANN COTONIO-SHAFFER) erhielt WENDEL Ausbeuten von 85.2—96.5 %. Bei ganz frisch redestillierten BTS-Lösungen betrug die Ausbeute immer über 90 %. Beachtet man ferner, dass die MS-Bestimmung nach Friedemann-Cotonio-Shaffer auch zu geringen MS-Verlusten Anlass gibt, muss dieses Resultat als sehr gut angesehen werden. — Es sei hier noch erwähnt, dass WENDEL die schlechtere Ausbeute nach dem Verfahren von KENDALL und FRIEDEMANN durch Polymerisation eines Teils der BTS beim Kochen auf dem Wasserbade erklärt.

Im Folgenden soll die in dieser Arbeit verwendete Methodik etwas eingehender geschildert werden, die von mir, hauptsächlich auf den Untersuchungen von KENDALL und FRIEDEMANN basierend, zur Bestimmung der BTS in kleinen Harnquantitäten ausgearbeitet wurde.<sup>1</sup>

### 1. Enteiweissung des Harns.

Falls der Harn Eiweiss enthält, ist dieses mit Metaphosphorsäure oder Natriumwolframat und Schwefelsäure nach passender Verdünnung auszufällen. Von dem Filtrat wird eine Menge verwendet, die für die BTS-Bestimmung 10—20 cm<sup>3</sup> Harn entspricht, für die MS-Bestimmung 2—3 cm<sup>3</sup> Harn.

### 2. Reduktion.

In einer Kochflasche von 250 cm<sup>3</sup> wird der Harn mit Wasser auf 40—80 cm<sup>3</sup> verdünnt (abhängig von der verwendeten Schwefelsäuremenge), Zinkstaub zugesetzt (1.5—2.5 g) und 2—4 Tropfen gesättigte Kupfersulfatlösung. Die Kochflasche wird mit einem Rückflusskühler versehen und auf das kochende Wasserbad gesetzt. Hiernach wird allmählich mit einem Tropftrichter durch den Rückflusskühler 50 vol. % Schwefelsäure hinzuge tropft (10—20 cm<sup>3</sup>) und 2 ½—3 Stunden gekocht.

<sup>1</sup> Bei der Ausarbeitung der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Bestimmung der BTS im Harn (KRUSIUS, 1938) waren dem Verfasser die Befunde von WENDEL unbekannt, weswegen diese schnelle Reduktion in der Kälte auf ihre Verwendbarkeit für Harnbestimmungen nicht eingehender geprüft wurde. Einige orientierende Versuche führten zu ungenauem Resultat, so dass es sicherer schien in der Hitze zu reduzieren.

Bei der Reduktion im Harn muss ein ziemlicher Überschuss von Zink und Schwefelsäure verwendet werden, da der Harn scheinbar viele andere Verbindungen enthält, die durch den Wasserstoff in statu nascendi reduziert werden, und man sonst keine gute Ausbeute an BTS erhält, Gewöhnlich reichen zur Behandlung von 10 cm<sup>3</sup> Harn 1.5 g Zink und 12—16 cm<sup>3</sup> der 50 vol % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, für Harnmengen bis zu 20 cm<sup>3</sup> reichen 2.0—2.5 g Zink und 16—20 cm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die endgültige Schwefelsäurenkonzentration soll nicht mehr als 10—15 vol. % betragen (Maximal 20 vol. %).

### 3. Entfernung des Zinks.

Nach vollendeter Reduktion wird der Rückflusskühler mit einer kleinen Wassermenge ausgespült und die Lösung durch ein kleines Filter in eine Massflasche filtriert und bis zur Marke aufgefüllt (am praktischsten 100 cm<sup>3</sup>). Hiervon wird dann ein aliquoter Teil (20—40 cm<sup>3</sup>) in einer Massflasche unter Eiskühlung mit der berechneten Menge Natriumhydroxyd neutralisiert und wieder bis zur Marke (100 cm<sup>3</sup>) aufgefüllt. (Die Lösung soll Phenolrotpapier leicht rot färben). Hierbei fällt das Zink quantitativ als Hydroxyd aus. Ein Überschuss an Lauge muss natürlich vermieden werden, da sich bekanntlich die Fällung sonst löst. Die Zinkfällung wird dann abfiltriert und ein aliquoter Teil des Filtrats, welches mit Schwefelwasserstoff keine Fällung mehr gibt, wird weiter behandelt.

Die Entfernung des Zinks schien deswegen erforderlich, weil unter gewissen Umständen ein Verlust von bis zu 80 % des Zinklaktats eintreten kann, wie KENDALL und FRIEDEMANN hervorheben. Falls die MS-Bestimmung direkt anschliessend an die Reduktion vorgenommen wird kann unter Umständen die Ausfällung des Zinks auch unterbleiben.<sup>1</sup>

### 4. Entfernung der Kohlenhydrate und anderer störender Substanzen.

Ein aliquoter Teil des Filtrats nach der Entfernung des Zinks (50 cm<sup>3</sup>) wird dann wieder in eine Massflasche gebracht und mit Calciumhydroxyd (in Substanz) und halbgesättigter Cupfersulfatlösung versetzt zur Ausfällung der Kohlenhydrate (SALKOWSKY, 1879; VAN SLYKE, 1917). Nach einer halben Stunde wird die Flasche bis zur Marke aufgefüllt und die Fällung abfiltriert. Das Filtrat welches farblos ist, muss frei von Kohlenhydraten und ähnlichen Verbindungen sein. (MOLISCH'S  $\alpha$ -Naphtol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Probe negativ).

Die Ausfällung mit Kupfer-Kalk darf nicht vor der Reduktion vorgenommen werden, da sonst 85 % und mehr Brenztraubensäure mitentfernt werden, wie ich durch Bisulfitbestimmung der BTS feststellen konnte.

Zur Ausfällung verwendet man bei Verdünnung auf 100 cm<sup>3</sup> unabhängig von der Harnquantität am besten 10 g Calciumhydroxyd und 10 cm<sup>3</sup> Kupfersulfat.

<sup>1</sup> In dieser Arbeit wurde das Zink in allen Bestimmungen ausgefällt, wie auch die Bestimmung immer am selben Tage zu Ende geführt wurde. Mit einiger Übung kann eine Person pro Tag 3—4 MS- und BTS-Bestimmungen vornehmen.

### 5. Bestimmung der MS vor der Reduktion und der »Gesamt-MS« nach der Reduktion.

Das Filtrat nach der Kupfer-Kalkfällung wird dann auf gewöhnliche Art zur MS-Bestimmung verwendet.

Um den wahren Gehalt an BTS festzustellen muss natürlich gleichzeitig die »präformierte« MS ermittelt werden. Dies geschieht indem der eiweissfreie Harn (vgl. Punkt 1) mit Kupfer-Kalk behandelt wird, wie in Punkt 4. Hierbei wird nicht nur aller Zucker sondern auch die BTS zum grössten Teile ausgefällt, welches sehr wichtig ist, da sie bei der titrimetrischen MS-Bestimmung zu Störungen Anlass geben kann. Derart wird die langwierige Trennung der BTS von der MS nach KRISHNA und SREENIVASAYA (1928) vermieden.

Damit der Analysenfehler möglichst klein wird, soll die Kupferkalkfällung vor und nach der Reduktion mit der entsprechenden Harnmenge ausgeführt werden. Dies erhellt am besten ein einfaches Beispiel.

Zur Reduktion werden 10 bzw. 20 cm<sup>3</sup> Harn verwendet. Nach dem Kochen wird auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Zur Zinkfällung werden 40 bzw. 20 cm<sup>3</sup> entsprechend 4 cm<sup>3</sup> Harn benutzt. Bei der Zinkfällung wird wieder auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, von dem Filtrat nimmt man 50 cm, welches 2 cm<sup>3</sup> Harn entspricht, zur Kupfer-Kalk-Fällung und füllt wieder bis zu 100 cm<sup>3</sup> auf. Die endgültige Verdünnung ist also 2 cm<sup>3</sup> Harn in 100 cm<sup>3</sup>.

Zur MS-Bestimmung ohne Reduktion muss daher 2 cm<sup>3</sup> Harn zur Kupfer-Kalkfällung verwendet werden und ebenfalls auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt werden. Benutzt man zur Reduktion 15 cm<sup>3</sup> Harn erhält man schliesslich ganz analog die Verdünnung 3 cm<sup>3</sup> Harn in 100 cm<sup>3</sup>, sodass zur MS-Bestimmung entsprechend 3 cm<sup>3</sup> auf 100 verdünnt werden müssen.

### 6. Berechnung des BTS-Gehalts.

Auf die Methode zur Bestimmung der MS soll noch weiter unten eingegangen werden. In dieser Arbeit wurde die Methode von LIEB und ZACHERL. (1932) hierzu verwendet. Bei der Titrierung entspricht die Differenz des Jodverbrauchs der MS-Bestimmungen mit und ohne vorhergehender Reduktion dem BTS-Gehalt der untersuchten Probe (1 cm<sup>3</sup> 1/400-n Jodlösung entspricht 0.11 mg BTS).

### 7. Erforderliche Reagenzien.

Zinkstaub (Zincum pulveris. pro analysis).

50 vol. % Schwefelsäure (Acid. sulfuric. pro analysis, D=1.84, verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser).

Gesättigte Kupfersulfatlösung (CuSO<sub>4</sub> pro analysis, in der Kälte gesättigte Lösung).

½ gesättigte Kupfersulfatlösung.

Calcium-hydroxyd (Calcium hydricum oxydatum pro analysis).

Ca. 40 % NaOH (pro analysis). Die Menge, die zur Neutralisation von 1 cm<sup>3</sup> 50 vol. % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht wird, muss durch Titrierung gegen Phenolrot ermittelt werden.

Reagenzien zur Milchsäurebestimmung nach LIEB und ZACHERL.

## 8. Genauigkeit der Methode.

Mit dieser Methode wurden in reinen Pyruviatlösungen Ausbeuten von 80—90 % erhalten. Trotz mannigfacher Variationen der Reduktion und des ganzen Verfahrens liess sich ein solcher Verlust von 10—20 % nicht ausschliessen.<sup>1</sup>

Bei der Beurteilung dieses Resultats muss aber auch berücksichtigt werden, dass bei der MS-Bestimmung schon Verluste von 1—5 % und ev. mehr auftreten können (vgl. weiter unten).

Im Folgenden seien die Werte einiger Bestimmungen in reinen Pyruviatlösungen angeführt (vgl. Tab. Nr. 6).

Tabelle Nr. 6.  
*BTS-Bestimmung in reinen Lösungen.*

Zugesetzt BTS in mg	Gefunden BTS in mg	Ausbeute in %
50.00 <sup>1</sup>	47.09	94.2
50.00 <sup>1</sup>	44.65	89.3
10.00 <sup>1</sup>	9.26	92.6
6.01	5.87	97.7
6.01	5.76	95.8
5.99	5.25	87.7
5.96	5.36	90.0
5.00	4.02	80.4
2.99	2.56	85.6
2.50	2.03	80.1
1.59	1.30	81.7
1.00	0.75	75.0

<sup>1</sup> frisch redestillierte BTS, bei den anderen Bestimmungen Na-pyruvat.

Um den Einfluss verschiedener Mengen von Zink und Schwefelsäure auf die Reduktion der BTS zu untersuchen, wurde u. a. nebenstehende Versuchsserie ausgeführt (vgl. Tabelle Nr. 7 a).

Ferner wurde untersucht, welchen Einfluss die Ausfällung des Zinks bei gleich anschliessender MS-Bestimmung auf die Ausbeute hat (vgl. Tabelle Nr. 7 b). Hierbei wurde festgestellt, dass auch durch die Zinkausfällung ein kleiner Verlust eintreten kann.

Beim Zusatz von BTS zum Harn wurde beinahe die gleiche Ausbeute erhalten wie in reinen BTS-Lösungen (vgl. Tabelle Nr. 8).

*Zusammenfassend kann über die hier beschriebene Methode zur Bestimmung der BTS in verhältnismässig kleinen Harnmengen gesagt werden, dass sie im allgemeinen 80—90 % Ausbeute ergibt. Mit dieser Methode findet*

<sup>1</sup> Reduktionsversuche ohne Erwärmen auf dem Wasserbade sind in diesem Zusammenhange nicht ausgeführt worden.

Tabelle Nr. 7 a.

Die Ausbeute an BTS bei verschiedener Konzentration des Reduktionsmittels.  
(Bei allen Bestimmungen 3ggt. Kupfersulfatlösung.)

Zugesetzt		Gesamtvolumen bei der Reduk- tion in cm <sup>3</sup>	Zugesetzt BTS in mg	Gefunden BTS in mg	Ausbeute in %
Zink in g.	50 vol.% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in cm <sup>3</sup>				
0.5	5.0	26	5.19	2.62	50.4
1.0	8.0	26	5.19	3.14	60.5
1.5	12.0	26	5.24	3.77	71.9
2.0	16.0	40	5.15	3.51	68.2
2.0	20.0	40	5.99	5.25	87.7
2.0	20.0	40	5.96	5.36	90.0
2.5	20.0	40	5.15	3.62	70.3

Tabelle Nr. 7 b.

Einfluss der Zink-Ausfällung auf die Ausbeute an BTS.

Zugesetzt BTS in mg	Ohne Zinkausfällung		Mit Zinkausfällung	
	Gefunden BTS in mg	Ausbeute in %	Gefunden BTS in mg	Ausbeute in %
1.00	0.81	81.0	0.75	75.0
2.00	1.61	80.5	1.58	79.0

Tabelle Nr. 8.

Zusatz von BTS zum normalen Harn.

Harnmenge in cm <sup>3</sup>	Gefunden im Harn MS + BTS, berechnet als BTS in mg	Zugesetzt zum Harn mg BTS	Ausbeute an BTS.		
			Gefunden mg BTS	Berechnet mg BTS	%
20	4.97	6.40	10.03	11.37	88.2
20	5.98	6.40	10.78	12.38	87.0
12.5	7.21	43.30	40.63	50.51	80.4
12.5	7.08	43.30	38.78	50.38	77.0

man regelmässig etwas BTS im Harn, wenn auch oft sehr kleine Mengen. Negative Werte, wie sie von KENDALL und FRIEDEMANN im Tagesharn gefunden wurden, erhält man bei sorgfältiger Ausführung der Analyse fast nie, vorausgesetzt, dass bei der anschliessenden MS-Bestimmung keine grösseren Verluste eintreten.

Die Verfahren zur Bestimmung der KGS und BTS, die hier zur Anwendung kamen, sind, wie aus dem Vorhergehenden hervorgeht, umständlich und langwierig und mit einem verhältnismässig grossen Fehlerprozent behaftet. Da aber vorerst keine einfacheren und genaueren Methoden vorliegen, muss man sie als die einzig für quantitative Harnuntersuchungen in Frage kommenden Verfahren ansehen. In der vorliegenden Arbeit dürften die ermittelten Resultate umsomehr genügen, als es vor allem darauf ankam eventuelle Veränderungen in der Ausscheidung der BTS und KGS nachzuweisen, während die Ermittlung der absoluten Normalwerte nur untergeordnete Bedeutung hatte.

#### 4. Bestimmung der Milchsäure.

Wie schon erwähnt, wurde in dieser Arbeit die MS, abgesehen von einigen geringfügigen Veränderungen, nach der Methode von LIEB und ZACHERL (1932) bestimmt. Das Prinzip bei dieser Bestimmung, welches auf dem ursprünglichen Verfahren von FÜRTH und CHARNASS (1910) und dessen zahlreichen Verbesserungen (u. a. CLAUSSEN, 1922; HIRSCH und KAUFFMANN, 1924; EMBDEN, 1925; FRIEDEMANN, COTONIO und SHAFFER, 1927; LEHNARTZ, 1928) basiert, ist kurz folgendes: Ein aliquoter Teil des eiweiss- und kohlenhydratfreien Filtrats (vgl. die Bestimmung der BTS) wird in einer Spezialapparatur in Mangansulfat-Schwefelsäurelösung durch Kaliumpermanganat allmählich oxydiert. Das gebildete Acetaldehyd wird mittels eines gleichmässigen Luftstroms durch einen besonders effektiven Kühler und einen Gasverteiler (Glasfrittenplatte) in eine Bisulfidlösung geleitet und jodometrisch ermittelt.

Auch diese verbesserte Methode gibt keine 100 % Ausbeute an Acetaldehyd. LIEB und ZACHERL (1932) erhielten bei Bestimmung verhältnismässig grosser MS-Mengen (1.925—2.404 mg) Verluste von bis zu 3.4 %. In diesem Laboratorium wurde diese Methode zur Bestimmung viel kleinerer MS-Mengen verwendet (untere Grenze ca. 0.05 mg MS), wobei noch zufriedenstellende Resultate zu erhalten waren.

In der Tabelle Nr. 9 sind einige Kontrollbestimmungen der Methode mit frisch zubereiteten Calciumlaktatlösungen angeführt, die in Bezug auf die analysierte MS-Quantität dem MS-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Harnvolumina entsprechen. Um einen zu grossen Fehler zu vermeiden, soll man im Allgemeinen nicht weniger als 0.1 mg MS zur Bestimmung nehmen. Im Harn kann die Bestimmung schon aus einer Filtratmenge erfolgen, die 0.3—0.6 cm<sup>3</sup> entspricht.

Aus der Tabelle Nr. 9 geht hervor, dass der Fehler bei Bestimmung kleiner MS-Mengen mit der Apparatur von LIEB und ZACHERL bis zu 7.3 % betragen kann. Meistens ist aber der Verlust an Acetaldehyd sehr gering. Zu beachten ist bei Verwendung dieser Apparatur, dass nach

Tabelle Nr. 9.

*MS-Bestimmungen in reinen Lösungen von Calciumlaktat.*<sup>1</sup>

0.0025-n Jodlösung in cm <sup>3</sup>	mg Milchsäure		
	berechnet	gefunden	Ausbeute in %
2.60	0.3070	0.2912	96.2
2.68	0.3070	0.3002	99.3
2.80	0.3070	0.3130	101.9
1.27	0.1535	0.1423	92.7
1.32	0.1535	0.1478	96.2
1.35	0.1535	0.1512	98.5
1.36	0.1535	0.1523	99.2
1.39	0.1535	0.1556	101.3
1.40	0.1535	0.1568	102.2
1.41	0.1535	0.1579	102.8
1.38	0.1535	0.1545	100.6
1.36	0.1535	0.1523	99.2
1.36	0.1535	0.1523	99.2
			Mittlere Ausbeute 99.2 Mittlerer Fehler — 0.8 % (— 7.3 bis + 2.8 %)

<sup>1</sup> ausgeführt von AUVINEN und BACKMAN (1936), wofür ich ihnen Dank schulde.

einiger Zeit die Poren der Glasfrittenplatte durch geringe Mengen Braunstein verstopft werden, sodass leicht ein Teil des Acetaldehyds durch die Kapillare, durch welche das Permanganat zugetropft wird, verloren gehen kann. Man muss deswegen den Luftstrom entsprechend verstärken oder den Gasverteiler öfters auswechseln.<sup>1</sup>

Bei der Bestimmung kleiner MS-Mengen soll ferner die Oxydation vorteilhafter Weise durch Zutropfen einer doppelt schwächeren Kaliumpermanganatlösung (1/200-n) vorgenommen werden, als wie LIEB und ZACHERL (1932) sie verwendeten.

Zur jodometrischen Titrierung des an das Acetaldehyd gebundenen Bisulfits wurde immer eine 1/400-n Jodlösung zugewandt, die jedesmal frisch aus einer 1/10-n Lösung bereitet wurde. 1 cm<sup>3</sup> dieser Lösung entspricht 0.1125 mg MS. Erwähnt muss auch werden, dass alle MS- bzw. BTS-Bestimmungen gleichzeitig in zwei Apparaten vorgenommen wurden; in den Tabellen ist meist der Mittelwert dieser Parallelbestimmungen angegeben.

<sup>1</sup> In dieser Arbeit wurde ein grosser Teil der Bestimmungen mit einer schwach gestellten Vakuumpumpe ausgeführt.

1933 wurde von FUCHS eine Verbesserung der Apparatur von LIEB und ZACHERL ausgearbeitet. Nach der Methode von FUCHS soll die Ausbeute an Acetaldehyd völlig quantitativ sein und der Fehler der Parallelbestimmungen soll nur 1 Tropfen der 1/200-n Natriumthiosulfatlösung betragen. In dieser Arbeit kam die Apparatur von FUCHS zur MS-Bestimmung nicht zur Anwendung, jedoch wurde ein Teil der Untersuchungen unter Berücksichtigung der von FUCHS angegebenen Fehlerquellen des Verfahrens von LIEB und ZACHERL ausgeführt. Erstens wurde an dem Milchsäurebestimmungsapparat, wie FUCHS vorgeschlagen hatte, das Glasrohr, durch welches das Permanganat hinzutropft wird, bis nah an den Boden des Destillationskolben heran verlängert, sodass das Permanganat beim Austritt direkt mit der zu oxydierenden Flüssigkeit in Berührung kam. Hierdurch wird ein gleichmässiges Kochen erreicht, ohne dass Kochsteine oder Talk hinzugefügt werden brauchen, vor allem soll aber derart der Acetaldehyd nicht weiter oxydiert werden. — Zweitens wurde das Glasrohr, welches mit der Glasfrittenplatte endigt, mit Normalschliff versehen, sodass man nach beendigter Aldehydestillation das Filter abnehmen und zwecks Spülung Wasser hindurchblasen kann. Diese Einrichtung wurde vorgenommen, weil nach FUCHS' Beobachtung, beim Aufhören der Destillation ein geringer Teil der Bisulfatlösung in der Vorlage durch das Filter in den Stengel gesaugt wird und so zu kleine Aldehyd- ausbeuten erhalten werden. — Drittens wurde der Tropftrichter, in welchem 1/200-n Permanganatlösung ist, vergrössert um ein Auffüllen während der Bestimmung zu vermeiden. — Ein Teil der Bestimmungen wurde schliesslich auch unter Verwendung einer Braunsteinaufschwemmung als Oxydationsgemisch vorgenommen, wie dies von MÜLLER-PARCHAM (1933) vorgeschlagen worden ist.

HINSBERG und AMMON (1936) haben ferner die Verwendung ihrer Vakuumdestillationsapparatur (Vacap) zur Bestimmung der MS nach dem Prinzip von FÜRTH und CHARNASS vorgeschlagen. So einfach und genau dieses Verfahren auch erscheint, dürfte es doch etwas unspezifisch sein. Da nämlich die Destillation des Acetaldehyds im Vakuum (ca. 15 mm Hg) bei einem Temperaturunterschied von 65—60° auf 20—15° vorsichgeht, scheint es sehr wahrscheinlich, dass auch höhere Aldehyde als Acetaldehyd und andere flüchtige Carbonylverbindungen (z. B. Acetonkörper) von dem vorgelegten Bisulfat abgefangen werden. Bekanntlich wurde von LIEB und ZACHERL (1932) der effektive Aussen- und Innenschichtkühler eingeführt, um bei der Destillation die Kondensation aller anderen flüchtigen Verbindungen ausser dem Acetaldehyd (Sp. 21°) zu erreichen.

Zu erwähnen ist auch noch die Methode von LAUERSEN und WAHL-LÄNDER (1938), die die MS neben der OBS in dem weiter unten beschriebenen Destillationsapparat von LAUERSEN (1935) bestimmen. Hiergegen wäre einzuwenden, dass dieses Verfahren recht umständlich wird, da neben der MS immer parallel die OBS durch Bichromatoxydation und Abfangen in Salicylaldehyd-Kalilauge bestimmt werden muss. Ferner müsste man doch wohl in einer dritten Bestimmung den Gehalt an Acet-



essigsäure und präformiertem Aceton ermitteln, obwohl LAUERSEN und WAHLÄNDER hierüber keine Angaben machen, denn auch diese Verbindungen werden vom Bisulfit abgefangen. Vor allem aber dürfte die Methode deswegen nicht in Frage kommen, weil im Apparat von LAUERSEN auch aus CS durch Oxydation Aceton gebildet wird, wie weiter unten berichtet ist.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde auch versucht die kolorimetrische MS-Bestimmung nach MENDEL und GOLDSCHIEDER (1925) für Harnbestimmungen zu verwenden. Leider aber bildet der Harn bei Zusatz der konzentrierten Schwefelsäure und des Veratrols nach dem Erwärmen eine braune Färbung, die die rote MS-Farbe verdeckt und so eine photometrische Bestimmung verhindert. Dasselbe gilt auch für die Methode von DISCHE und LASZLO (1927).

## 5. Bestimmung der Citronensäure.

Die CS wurde nach der Methode von PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936) bestimmt. Hierbei wird die enteiusste Lösung mit Schwefelsäure zur Entfernung störender Verbindungen gekocht, dann abgekühlt und mit einem Überschuss von Bromwasser behandelt. Die eventuell entstehende Fällung wird abfiltriert und dann im Scheidetrichter mit KBr und einem Überschuss von  $\text{KMnO}_4$  oxydiert. Nach vollendeter Oxydation der CS zu Pentabromaceton wird die Analyse mit Wasserstoffsperoxyd entfärbt und mit Petroläther extrahiert, wobei das Pentabromaceton quantitativ in den Äther übergeht. Aus dem Petroläther wird das Pentabromaceton in Natriumsulfitlösung aufgenommen, wobei sich eine gelb-braune Farbe bildet, die in Pyridinlösung haltbar ist und stufenphotometrisch bestimmt werden kann.

Die gelb-braune Farbe ist der CS-Konzentration direkt proportional; die Extinktionswerte bei Konzentrationen vom 0.1—1.0 mg CS bilden eine Gerade. Da die stufenphotometrische Bestimmung immer einen kleinen subjektiven Fehler mitsichbringt, soll jeder, der CS-Bestimmungen vornimmt, eine eigene Extinktionsgerade anlegen bzw. den Extinktionskoeffizienten berechnen (vgl. Tabelle Nr. 10).

Die gefundenen Extinktionswerte lagen zwischen den entsprechenden Werten von PUCHER, SHERMAN und VICKERY, welche das überschüssige Permanganat und den Braunstein entweder mit Ferrosulfat oder mit Wasserstoffsperoxyd entfernten.

Zur Kontrolle wurde auch einige Vergleichsbestimmungen mit der Thunberg-Methodik in Zusammenarbeit mit HAGELSTAM vorgenommen, die gut übereinstimmende Werte ergaben (Tabelle Nr. 11).

Über die Spezifität der Pentabromacetonmethode hat HALLMAN<sup>1</sup> genauere Untersuchungen vorgenommen. Nach ihm gibt Brenztrauben-

<sup>1</sup> vgl. die demnächst erscheinende Dissertation von HALLMAN »Über die CS-Bildung in tierischen Geweben«.

Tabelle Nr. 10.

*Extinktionswerte der CS-Bestimmung.*

CS in mg <sup>1</sup>	Extinktionswerte <sup>2</sup>		
	nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY		nach KRUSIUS
	Entfärbung mit FeSO <sub>4</sub>	Entfärbung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Entfärbung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.10	0.155	0.110	0.178
0.15			
0.20	0.361	0.217	
0.25			0.270
0.30	0.328	0.340	
0.50			0.581
0.75	1.119	1.080	
1.00			

<sup>1</sup> 0.1 % CS-Lösung (1.093.8 g C<sub>3</sub>H<sub>4</sub> (OH) (COOH)<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O in 1000 cm<sup>3</sup> 1-n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird 20 mal mit 1-n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verdünnt. (5 mg %-Lösung.)

<sup>2</sup> Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.

Tabelle Nr. 11.

*Parallellbestimmungen mit der Thunberg-Methodik und der Pentabromacetonmethode.*

CS-Lösung in mg % <sup>1</sup>	Gefundene CS in mg %	
	Thunberg-Sjöström-Methodik	Pucher-Sherman-Vickery
2.195	2.186	2.233
3.000	2.972	3.012
3.250	2.998	3.190

<sup>1</sup> alle CS-Mengen sind ohne das Kristallwasser berechnet.

säurealdol, OBS und Buttersäure auch eine leichte Farbe bei der CS-Bestimmung, aber meistens erst in Konzentrationen, die mehr als 50 mal grösser sind als die der CS. HALLMAN kam zu dem Ergebnis, dass die Pentabromacetonmethode für Bestimmungen in tierischen Substraten hinreichend spezifisch ist und exakte Werte gibt. Im Harn kommen die drei erwähnten Verbindungen nie in solchen grossen Mengen vor, dass hieraus Fehler entstehen könnten.

## 6. Die Bestimmung der Acetonkörper.

Die AK wurden nach der Methode von LAUERSEN (1935) bestimmt, die auf der Salicylaldehyd-Farbreaktion von FABINYI, FROMMER und EMILEWICZ fusst. In einer Spezialapparatur wird der eiweissfreie Harn (bei Bedarf Enteiweissung mit 10 % Metaphosphorsäure, nicht Trichloressigsäure!) mit  $\frac{1}{4}$  Vol. 10 % Schwefelsäure gekocht, wobei das präformierte Aceton und das aus Acetessigsäure abgespaltene Aceton in eine über dem Kolben befindliche Vorlage mit Salicylaldehyd und starker Kaliumhydroxydlösung überdestilliert werden. Hierbei bildet sich ein orange-gelber Farbstoff (o-Dioxybenzalacetone), der genau wie bei der BTS-Bestimmung mit Salicylaldehyd stufenphotometrisch bestimmt wird.

Bei der Photometrie benutzt man als Vergleichslösung nicht Wasser sondern Salicylaldehyd und Kaliumhydroxyd in denselben Mengen wie in der Analyse. Die Methode ist sehr empfindlich und erlaubt noch die genaue Bestimmung von ca. 10  $\gamma$  Aceton.

Zur Bestimmung der OBS wird nach LAUERSEN, nachdem alles Aceton überdestilliert ist, die Vorlage mit Salicylaldehyd und Kaliumhydroxyd gewechselt und zu der Analyse  $\frac{1}{5}$  Vol. 5 % Kaliumbichromatlösung zugegeben, wonach wieder gekocht wird. Hierbei werden konstant 70 % der OBS zu Aceton oxydiert, während der Rest zu Essigsäure und anderen unbekanntem Verbindungen oxydiert wird. Der bei der photometrischen Bestimmung erhaltene Acetonwert soll mit dem empirischen Koeffizienten 2.58 zur Berechnung der entsprechenden OBS-Konzentration multipliziert werden.

Bei Harnbestimmungen bedarf man zur quantitativen Ermittlung des Acetons und der Acetessigsäure, wenn die qualitativen Acetonproben negativ ausfallen, mindestens 10 cm<sup>3</sup>, besser aber 20—30 cm<sup>3</sup>. Da aber bei der OBS-Bestimmung schon 0.5—2.0 cm<sup>3</sup> Harn eine deutliche Farbe gibt, empfiehlt es sich diese Bestimmungen getrennt vorzunehmen, indem man aus einer grösseren Probe den Gehalt an Aceton und Acetessigsäure ermittelt und aus einer kleineren Probe den Gehalt an Gesamtacetonkörper nach der Oxydation mit Bichromat. Zur Errechnung des Gehalts an OBS ist dann der erhaltene Acetonwert abzuziehen vor der Multiplikation mit dem empirischen Koeffizienten.

Zur Ermittlung der Extinktionsgerade wurden einige Bestimmungen in reinen, frisch zubereiteten Aceton-Lösungen vorgenommen. Als Vergleichslösung wurden in dieser Arbeit immer die entsprechend verdünnten, unerwärmten Vorlagereagenzien benutzt (vgl. Tabelle Nr. 12).

Da die BTS dieselbe Reaktion gibt, musste vor allem untersucht werden, ob sie im Lauersenschen Apparat in die Vorlage übergeht. In zahlreichen Versuchen, die in diesem Laboratorium ausgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass die BTS bei der Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure nicht stört (vgl. Tab. Nr. 13).

Die Beispiele der Tabelle Nr. 12 zeigen, dass die BTS bei der ersten

Tabelle Nr. 12.

*Extinktionswerte reiner Acetonlösungen.*

Aceton zugesetzt in $\gamma$ (0.001 mg)	Extinktionswert <sup>1</sup>
10	0.09
20	0.18
30	0.27
50	0.44
70	0.61
90	0.78

<sup>1</sup> Filter hellgrün S 53; 2 cm Schichtendicke (nach URBACH, 1931).

Tabelle Nr. 13.

*Prüfung frischer BTS-Lösungen im Lauersen'schen Apparat ohne Kaliumbichromatzusatz.*

Zugesetzt BTS in mg <sup>1</sup>	Extinktionswert	Berechnet als Aceton in mg
42.0	0.06	0.0055
21.0	0.02	0.0015
4.2	0.01	0.0008

<sup>1</sup> frisch redestillierte BTS; die Bestimmungen wurden in Zusammenarbeit mit KALLIALA und VILKKI ausgeführt.

Destillation ohne Zusatz von Bichromat nur einen ganz minimalen Fehler verursacht. Dagegen erhielten wir nach der Oxydation von alten BTS-Lösungen oft sehr starke Farbbildung. Nähere Untersuchungen in diesem Laboratorium haben gezeigt, dass dies durch Polymerisationsprodukte in unreinen BTS-Lösungen, vor allem durch Brenztraubensäurealdol, bedingt ist. Werden ganz frisch-redestillierte BTS-Lösungen oder reinstes Natriumpyruvat (Hoffmann-La Roche) verwendet, erhält man auch nach der Bichromatbehandlung keine deutliche Farbbildung in der Vorlage (vgl. Tabelle Nr. 14).

Auch von der CS ist bekannt, dass aus ihr bei der Oxydation über Acetondicarbonsäure Aceton entstehen kann. Ihr Verhalten im Apparat von LAUERSEN dürfte dagegen bisher noch nicht geprüft worden sein.

Ohne Zusatz von Bichromat gibt die CS, wie zu erwarten stand, keine Reaktion. Bei der Oxydation mit Kaliumbichromat im Lauersen'schen Apparat wird dagegen ein grosser Teil der CS zu Aceton oxydiert und überdestilliert (vgl. Tabelle Nr. 15).

Tabelle Nr. 14.

*Prüfung reiner Natriumpyruvatlösungen im Lauerse'schen Apparat bei gleichzeitiger Oxydation mit Kaliumbichromat.*

Zugesetzt BTS in mg	Extinktionswert	Berechnet als Aceton in mg
4.0	0.05	0.005
8.0	0.08	0.008
12.0	0.02	0.002
16.0	0.10	0.011

Tabelle Nr. 15.

*Acetonbildung aus CS nach Zusatz von Kaliumbichromat im Apparat von Lauerse.*

Zugesetzt CS in mg	Aceton-Ausbeute in mg		OBS-Ausbeute in mg		
	Berechnet <sup>1</sup>	Gefunden	Berechnet <sup>1</sup>	Gefunden	%
30.0	8.29	2.36	21.39	6.09	28.5
20.0	5.53	4.24	14.27	10.94	76.7
10.0	2.76	1.74	7.12	4.49	63.0
5.0	1.38	0.38	3.56	0.98	27.5
2.5	0.69	0.12	1.78	0.32	17.8
1.0	0.28	0.11	0.72	0.29	39.6
0.5	0.14	0.06	0.36	0.16	45.0
0.25	0.07	0.02	0.18	0.06	34.3
			Mittlere Ausbeute an Aceton bzw. OBS in %		41.6 %

<sup>1</sup> 100 Mol CS entspricht 27.63 Mol Aceton bzw. 61.29 Mol OBS.

Aus der Tabelle 15 geht deutlich hervor, dass die CS sehr stark reagiert bei der OBS-Bestimmung nach LAUERSEN. Die Ausbeute an Aceton bzw. OBS schwankt ziemlich stark (ca. 18—77 %); dies wird wahrscheinlich durch ungleichmässige Oxydationsdauer oder durch verschieden starkes Kochen der Analyse bedingt. Jedenfalls geben noch Mengen von 0.25 mg CS deutliche Farbbildung. Da der Harn bei den OBS-Bestimmungen oft derartige Mengen CS enthält, muss man feststellen, dass man die OBS in CS-haltigen Lösungen nicht nach der Methode von LAUERSEN bestimmen kann. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Diese Feststellung wurde erst am Ende dieser Arbeit gemacht, nachdem schon alle OBS-Bestimmungen ausgeführt worden waren. Die OBS-Werte sollen daher im Folgenden mit angeführt werden, obwohl ihnen keine grössere Bedeutung zuzusprechen ist.

### pH-Bestimmung.

Die pH-Bestimmungen im Harns wurden nach der ursprünglichen kolorimetrischen Methode von MICHAELIS mit einem gewöhnlichen Komparator vorgenommen. Hierbei wurden folgende Indikatoren verwendet:  $\gamma$ -Dinitrophenol von pH 3.6—5.6, p-Nitrophenol von pH 5.3—7.4 und m-Nitrophenol von pH 6.8—8.6. — Ferner wurden auch einige Kontrollbestimmungen mit dem Elektropotentiometer von MISLOWITZER gemacht, die regelmässig etwas niedrigere Werte ergaben als die Indikatoren-Reihe von MICHAELIS.

### III. Experimentelle Untersuchungen bei Ratten über die Ausscheidung der Brenztraubensäure, $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Citronensäure sowie der Acetonkörper.

#### I. Die Wirkung verschiedener Nahrungsgemische.

Wie schon oben eingehend dargestellt wurde, ist bisher nur die Ausscheidung der CS bei verschiedenen Kostformen gründlicher untersucht worden. Über den Einfluss der Nahrung auf die Ausscheidung der anderen hier behandelten Verbindungen liegen dagegen fast garkeine zusammenhängende experimentelle Forschungen vor.

Was die CS anbetrifft, so haben die meisten Forscher hervorgehoben, dass die Ausscheidung dieser Säure mit dem Harn von dem Säure-Basen-Haushalt des Organismus abhängig ist. Eine Zunahme der CS-Konzentration des Harns soll immer durch eine Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts nach der alkalischen Seite, also durch »Alkalosis« hervorgerufen werden. Es wurde aber auch schon erwähnt, dass von verschiedenen Seiten, besonders auch in diesem Laboratorium, Befunde erhoben worden sind, die dafür sprechen, dass die CS-Ausscheidung der Nieren nicht nur als eine regulatorische Funktion des tierischen Organismus gegen Schwankungen in der Wasserstoffionenkonzentration des Körpers aufzufassen ist.

Aus dem oben gesagten erhellt sich ohne weiteres, dass es vor allem notwendig war die normale Ausscheidung aller dieser Verbindungen gemeinsam zu untersuchen. Hierbei schien es nicht nur wichtig die mengenmässige Ausscheidung mit dem Harn bei verschiedenen Kostformen zu erforschen, sondern auch festzustellen, inwiefern zwischen der Ausscheidung der einzelnen Säuren

irgendeine Korrelation oder vielleicht ein gewisser Antagonismus besteht. Besonders interessant musste es auch in diesem Zusammenhang sein zu untersuchen, ob die »Alkalosis« auch einen Einfluss auf die Ausscheidung der anderen Säuren hat.

Ehe ich auf diese Untersuchungen eingehe, möge noch kurz die verhältnismässig einfache Versuchsmethodik erläutert werden. Der grösste Teil der in dieser Arbeit ausgeführten Untersuchungen wurde mit Ratten vorgenommen. Diese Tiere waren nicht nur deshalb besonders geeignet, als sie sich bei den Belastungsversuchen als ziemlich widerstandsfähig erwiesen, sondern auch weil es am leichtesten war den alles fressenden Ratten geeignete Kostgemische konstanter Zusammensetzung zu bereiten. Vergleichsweise wurde auch einige Belastungsversuche an Kaninchen und Meer-schweinchen vorgenommen, über die weiter unten in einem speziellen Kapitel berichtet werden soll.

Die Harnuntersuchungen der Ratten bei verschiedenen Kostgemischen wurden in dieser Arbeit derart ausgeführt, dass die Tiere tagsüber Nahrung und Wasser in beliebiger Quantität erhielten und nachts (12 Stunden) zur Harnsammlung in speziellen Glas-trichtern gehalten wurden.

Von der Benutzung s. g. Stoffwechsellkäfige wurde bei den Rattenversuchen aus rein technischen Gründen abgesehen, da bei derartigen Käfigen die Gefahr besteht, dass ein Teil der Nahrung und vor allem der zertretene Kot von dem Harn weggeschwemmt und gelöst wird. Ferner ist es schwierig zu vermeiden, dass das Trinkwasser in den Harn tropft und denselben verdünnt.

Da die Ratten sich in kurzer Zeit daran gewöhnen tagsüber zu fressen und nachts ohne Futter und Wasser in den Glas-trichtern zu schlafen, schien diese Art der Harnsammlung am einfachsten und exaktesten. Um die Tiere an die Glas-trichter zu gewöhnen, wurden sie ausserdem meistens einige Nächte vor Beginn der Harn-untersuchungen in den Trichtern gehalten. Auf diese Art erhält man eine ziemlich gleichmässige 12-stündige Diurese.

Die Glas-trichter wurden aus alten, dickbauchigen Bierflaschen (2—10 Liter) durch Abschneiden des Bodens hergestellt. Der Hals der Flasche wurde mit einem ziemlich dichten Drahtnetz verschlossen, durch welches der Harn aber gut abfliesst. In jedem Trichter wurde ein doppelter Boden angebracht, dessen obere Fläche aus einen weitmaschigen Drahtnetz bestand, während die untere Bodenfläche von einem dichten Netz gebildet wurde. Der Zwischenraum zwischen den zwei Netzen war ca. 2—3 cm. Ein derartiger doppelter Boden war deshalb vorteilhaft, weil durch die weitmaschige obere Fläche auf der die Ratten lagen auch der Kot durch-



fiel. Hierdurch wird ein Zertreten des Kots und die Vermischung desselben mit dem Harn weitgehendst vermieden, vorausgesetzt, dass die Tiere keinen Durchfall haben. Bei dieser Anordnung ist ferner eine Koprophagie der Tiere ausgeschlossen, welches bei Vitaminversuchen von grosser Bedeutung ist.

Die Glastrichter, die meist für 4—5 Ratten von ca. 200—250 g waren, wurden in einem Stativ, mit dem Hals nach unten befestigt. Unter den Hals des Trichters wurde ein Massglas mit einem gewöhnlichen, kleinen Trichter gestellt, sodass der Harn beim Herabtropfen gleich durch etwas Baumwolle oder ein kleines Filter filtriert wurde. Die obere Öffnung des Rattentrichters wurde ausserdem mit einem Drahtnetz verschlossen.

Bei derartiger Harnsammlung erhält man meist völlig klaren Harn. Vor der Untersuchung soll der Harn aber trotzdem immer filtriert werden.

Um Schwankungen in der Zusammensetzung der verschiedenen Kostformen zu vermeiden, wodurch die Resultate unsicher geworden wären, wurden bei den Rattenversuchen nur Kostgemische aus weitgehendst gereinigten Nahrungsstoffen konstanter Zusammensetzung benutzt. Als normale gemischte Grundkost wurde eine Diät verwendet (Diät I, Tabelle Nr. 16), die sich in diesem Laboratorium bei Vitaminversuchen als Kontrollnahrung gut bewährt hat. Trotz des hohen Gehalts an Kohlenhydraten (50 % Reisstärke), dürfte dieses Kostgemisch I als gemischte Diät anzuspreehen sein, da der Gehalt an Eiweiss und Fett völlig ausreichend ist. Die notwendigen Mineralsalze und Ergänzungsnährstoffe (Vitamin, A, D und die B-Vitamingruppe) sind in der Kost in konstanter Menge enthalten. Einzelheiten über die Zusammensetzung und Zubereitung dieser Kost gehen aus Tabelle Nr. 16 hervor. Junge wachsende Ratten nehmen bei dieser Kost wöchentlich ca. 20 g und mehr zu. —

Neben der gemischten Kost (Diät I) wurde der Einfluss zuckerreicher (Diät II), eiweissreicher (Diät III) und fettreicher Kost (Diät IV) auf die Harnzusammensetzung untersucht. Die zuckerreiche Kost wurde durch Zugabe von 13 % Rohrzucker zur Grundkost I unter entsprechender Verminderung der anderen Bestandteile bereitet. Grössere Zuckermengen konnten der Kost leider nicht zugesetzt werden, da die Ratten eine noch süssere Kost nicht ordentlich frassen. Die nähere Zusammensetzung der Kost II erhellt sich ebenfalls aus Tabell Nr. 16. Leider konnte der Kohlenhydratgehalt der Diät II demjenigen der Diät I gegenüber nicht viel erhöht werden. Um aber trotzdem den Einfluss extremer Zuckermengen auf die Harnzusammensetzung zu untersuchen, wurden eine Reihe von Belastungsversuchen mit Traubenzucker ausgeführt.

Tabelle Nr. 16.

*Zusammensetzung der experimentellen Kostgemische für Ratten.*

	Gemischte Kost in %		Zuckerhaltige Kost in %		Eiweissreiche Kost in %		Fettreiche Kost in %	
	I	I A	II	II A	III	III A	IV	IV A
Kasein .....	20	18	17.4	15.6	60	54	20	17.3
Reisstärke .....	50	45	43.4	39.1	10	9	32	27.8
Rohrzucker ....	—	—	13	13	—	—	—	—
Hefe .....	13	13	11.5	11.5	13	13	13	13
Kokosfett .....	12	12	10.4	10.4	12	12	30	30
Salzmischung <sup>1</sup> ..	5	4.5	4.3	3.9	5	4.5	5	4.4
Natriumbicarbon.	—	7.5	—	6.5	—	7.5	—	7.5

<sup>1</sup> ähnllich der von Mc COLLUM angegebenen Salzmischung:

NaCl	10 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 %
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	30 %
MgSO <sub>4</sub>	10 %
Ca-laktat	10 %
FeCl <sub>3</sub>	1 %
KJ	0.03 %

*Erklärung zu Tabelle Nr. 16:* Zubereitung der Kostgemische. Die getrocknete Bäckerhefe wird in Wasser verrührt und kurz aufgeköcht, wonach das geschmolzene Fett zu gegeben wird. Anschliessend wird die notwendige Menge A- und D-Vitamin hinzugegropft und dann wird unter ständigen Umrühren das Mehlgemisch (Kasein, Reisstärke, ev. Rohrzucker und Natriumbicarbonat) dazugefügt.

Die Kost I, welche in diesem Laboratorium als Kontrolldiät bei Vitaminversuchen mit Ratten verwendet wird, wird demnach folgendermassen zubereitet: 80 g der Hefe werden mit 600 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und dazu fügt man 72 g Fett und 5 Tropfen Vogan und 5 Tropfen Vigantol. Schliesslich verrührt man mit dieser Mischung 450 g der Mehlmischung (Kasein 20 %, Reisstärke 50 % und Salzmischung 5 %).

Die anderen Kosten werden entsprechend zubereitet. Bei Kost II und II A wurden zu 80 g Hefe in 600 g Wasser und 72 g Fett 340 g der Mehlmischung gegeben. Bei der Bereitung von Kost IV bzw. IV A wurden zu 80 g Hefe (in 600 g Wasser) 180 g Fett und 340 g Mehlmischung gegeben.

Die Alkaliäte I A—IV A wurden analog zubereitet, nur wurde der Mehlmischung das Bicarbonat zugesetzt: Bei Diät I A und III A kamen auf 9 Teile Mehlmischung 1 Teil Natriumbicarbonat; bei Diät II A auf 9 Teile Mehlmischung 2 Teile Rohrzucker und 1 Teil Bicarbonat und bei Diät IV A auf 755 g Mehlmischung 100 g Bicarbonat.

Die Kostgemische dürften nur ganz geringe Mengen CS enthalten. C-Vitamin, welches die Ratten nicht brauchen, wurde nicht zugesetzt. Ferner enthielt die Kost kein E-Vitamin.

Die eiweisreiche Kost (Diät III, Tabelle Nr. 16) enthielt 60 % Kasein, während der Gehalt an Kohlenhydraten entsprechend vermindert wurde. Der Fettkost wurden 30 % Kokosfett zugesetzt, welches die grösste Fettquantität war, die noch in das Futter eingerührt werden konnte, ohne dass sich Fett abschied. Auch bei dieser Kost (Diät IV, Tabelle Nr. 16) wurde nur der Gehalt an Kohlenhydraten entsprechend vermindert, während die anderen Nahrungsbestandteile in denselben Mengen zugesetzt wurden.

## A. Gemischte Kost: Diät I.

Tabelle

Diät I. Gemischte Kost (15 Ratten)								
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydrazonfällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg				
				KGS	CS	MS	BTS	
5	1.33	—	—	—	—	0.54	0.08	
7	1.00	—	—	} 0.29	—	—	—	
8	1.33	—	45" >60"		—	—	—	
9	1.65	—	—		0.30	—	—	
10	1.65	—	—		—	—	—	
11	2.21	—	—		—	—	—	
12	2.30	—	—		—	0.64	—	
13 {	3.00	—	—		} 0.79	0.71	—	—
	3.00	—	—			0.40	—	—
	3.00	—	—			0.37	—	—
14	2.25	—	>60"		} 0.27	0.32	—	—
15	1.70	—	>60"	0.23		—	—	
16	2.00	—	—	—	—	0.59	0.06	
17	1.85	—	>60"	—	0.25	—	—	
18	2.38	—	—	} 0.42	—	—	—	
19	1.50	—	—		—	—	—	
20	1.76	—	—		—	—	—	
21	1.76	—	>60"	—	0.39	0.63	0.49	
22 {	2.00	5.8	>60"	} 0.04	—	—	—	
	2.00	6.1	20" >60"		—	—	—	
	2.50	5.8	>60"		—	—	—	
23 {	1.60	5.7	>60"	} 0.04	—	—	—	
	1.50	5.7	>60"		—	—	—	
	1.75	5.8	>60"		—	—	—	
24 {	1.40	5.6	—	} 0.04	—	—	—	
	1.40	5.8	—		—	—	—	
	3.00	6.8	—		—	—	—	

Die Resultate der Untersuchungen des Rattenharns bei Verabreichung dieser 4 Kostgemische sind in den Tabellen Nr. 17, 18, 19 und 20 zusammengestellt. Die Tabelle Nr. 21 enthält ferner die Ausscheidungsdurchschnittswerte der hier untersuchten Verbindungen übersichtlich zusammengestellt bei Verabreichung der verschiedenen Diäten.

*Besprechung der Resultate:*

(vgl. Tabelle Nr. 17 und Nr. 21).

Nr. 17.

Diät I A. Gemischte Kost + NaHCO <sub>3</sub> (10 Ratten)							
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydrazonfällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg			
				KGS	CS	MS	BTS
5	1.50	—	—	—	—	0.45	0.05
7	2.70	—	—	—	—	—	—
8	2.30	—	15"—25"	1.95	—	—	—
9	2.60	—	—		0.17	—	—
10	1.90	—	—	4.51	—	—	—
11	2.30	—	—		—	—	—
12	4.00	—	—		9.25	—	—
13 {	5.20	—	—	4.51	7.64	—	—
	4.20	—	—		9.98	—	—
14	2.40	—	5"—18"	3.58	8.64	—	—
15 {	1.80	—	8"—15"		7.16	—	—
	3.40	—	4"—13"	13.69	—	—	
16	2.50	—	—	—	—	0.53	0.00
17	2.00	—	6"—35"	—	6.00	0.42	0.15
18	2.30	—	—	2.21	—	—	—
19	2.00	—	—		—	—	—
20	4.50	—	—	—	—	0.46	0.27
21 {	3.00	—	5"—15"	—	16.65	0.59	0.35
	1.60	—	5"—15"	—	7.06		
22 {	3.80	8.2	7"—25"	5.35	12.83	—	—
	3.20	8.0	8"—21"		11.33	—	—
23 {	4.00	8.2	3"—11"	5.35	21.33	—	—
	3.40	8.5	8"—28"		11.62	—	—
24 {	2.20	8.2	—	4.77	—	—	—
	3.00	8.1	—		—	—	—

In der Tabelle Nr. 17 sind die Harnuntersuehungen der Ratten auf gemischter Kost auf der linken Seite zusammengestellt. Vor Beginn der Harnbestimmungen wurden die Tiere zur Gewöhnung bereits 5 Tage auf der Diät I gehalten. Harnuntersuchungen wurden an 21 aufeinander folgenden Tagen vorgenommen. Auf die einzelnen Werte braueht hier nicht eingegangen zu werden. In der Übersichtstabelle Nr. 21 sind die Durchschnittswerte dieser Harnuntersuchungen angeführt.

Die 12-stündige Ausscheidung der KGS, CS, MS und BTS mit dem Harn ist bei den Ratten ziemlich klein und beträgt für alle diese Säuren normal weit unter 1 mg. Die KGS-Werte betragen durchschnittlich 0.31 mg in 12-St. und schwankten zwischen 0.04

B. Zuckerhaltige Kost: Diät II.

Tabelle

Diät II. Zuckerhaltige Kost (13 Ratten)										
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cms <sup>2</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg						
				KGS	CS	MS	BTS	Aceton in γ	OBS	
3	2.60	5.8	10"—35"	0.46	2.55	—	—	—	—	—
	1.25	5.5	>60"		0.25	—	—	—	—	—
	1.00	5.8	>60"		0.18	—	—	—	—	—
4	1.00	5.9	—	0.08	0.14	—	—	—	—	—
	1.00	5.8	>60"		0.08	—	—	—	—	—
	1.67	5.8	—		0.99	—	—	—	—	—
5	2.20	5.9	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.80	5.8	—	—	0.65	—	—	—	—	—
	1.33	5.9	—	—	0.18	—	—	—	—	—
6	1.50	5.8	—	—	—	—	—	—	—	—
7	1.73	5.8	—	0.48	—	0.82	0.03	—	—	—
8	1.31	5.7	—		—	—	—	—	—	—
9	2.00	5.8	>60"	—	0.50	—	—	4.60	0.17	—
10	2.00	5.9	—	—	—	—	—	3.26	0.35	—
Am 10. Versuchstage Belastung mit Glucose per										
11 <sup>1</sup>	3.30	6.8	>60"	0.26	0.31	1.11	0.98	—	0.70 <sup>2</sup>	—

<sup>1</sup> Nyl ++.

<sup>2</sup> Gehalt an Gesamtacetonkörpern.

und 0.8 mg. Da die hier verwendete Bestimmungsmethode bei der Bestimmung kleiner KGS-Mengen einen verhältnismässig grossen Fehlerprozent hat, reicht es hin festzustellen, dass die 12-stündige KGS-Ausscheidung (Nachturin) bei Ratten beinahe immer unter 0.5 mg lag.

Die CS-Werte schwanken bei der gemischten Kost nur sehr wenig und sind meist etwas grösser als die KGS-Werte. Der Durchschnitt betrug 0.4 mg. Auch die MS-Werte sind von der selben Grösse, der Durchschnitt einiger Bestimmungen belief sich auf 0.6 mg in 12 St. Die BTS-Werte waren immer bedeutend kleiner als die MS-Werte meist nur ein Drittel derselben oder noch weniger.

(vgl. Tabelle Nr. 18 und Nr. 21).

Nr. 18.

Diät I I A. Zuckerhaltige Kost+NaHCO <sub>3</sub> (10 Ratten)									
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg					
				KGS	CS	MS	BTS	Aceton in γ	OBS
3	2.80	8.3	4''—16''	5.52	14.93	—	—	—	—
	2.20	7.6	1''—6''		15.93	—	—	—	—
4	3.50	8.4	5''—8''	5.52	12.98	—	—	—	—
	2.40	8.4	5''—12''		8.40	—	—	—	—
5	1.40	7.0	—	1.78	2.74	—	—	—	—
	0.80	7.6	—		3.63	—	—	—	—
6	1.80	8.5	—	1.78	—	—	—	2.70	2.44
7	2.80	8.5	—		7.47	0.52	0.40	—	—
8	1.85	8.6	—	2.64	—	—	—	—	—
9	3.80	8.5	—	5.39	9.03	—	—	4.56	2.10
10	3.10	8.5	—	—	13.82	—	—	2.56	3.16

os: 12 g/1 Kg Körpergewicht (30 %-Lösung.)

11 <sup>1</sup>	3.90	7.2	5''>60''	0.18	1.85	2.57	0.67	—	1.25 <sup>2</sup>
-----------------	------	-----	----------	------	------	------	------	---	-------------------

Anschliessend wurden 13 neue Ratten auf die Diät II gesetzt. Die erste Harnuntersuchung wurde am dritten Tage vorgenommen. Die Resultate der Bestimmungen sind in der Tabelle Nr. 18 auf der linken Seite zusammengestellt, sowie auch die Durchschnittswerte in der Übersichtstabelle Nr. 21.

Aus den erhaltenen Ergebnissen geht hervor, dass die Harnzusammensetzung der Ratten auf Diät II im Grossen und Ganzen die Gleiche ist wie bei den Versuchstieren auf gemischter Kost. Die Durchschnittswerte scheinen alle, mit Ausnahme des BTS-Wertes etwas höher zu liegen, da aber nur verhältnismässig wenige Harnanalysen stattfanden (der Harn wurde 7 Tage lang untersucht), kann diesem Unterschied keine grössere Bedeutung zugesprochen werden.

Das Harn-pH ist sowohl bei Diät I als auch bei Diät II etwas unter 6, die Durchschnittszahl für Diät I beträgt 5.9, für Diät II 5.8. — Auch die 12-stündige durchschnittliche Diurese war bei beiden Kostformen ziemlich die Gleiche.

Um den Einfluss von Zucker auf die Ausscheidung der hier behandelten Verbindungen noch eingehender zu prüfen, wurden auch mehrere Belastungsversuche mit Glucose ausgeführt.

In diesem Zusammenhange sei kurz auf die hierbei verwendete Technik eingegangen. Alle in dieser Arbeit an Ratten vorgenommenen Belastungsversuche wurden derart ausgeführt, dass den Ratten die Substanz in möglichst grosser Flüssigkeitsmenge mittels eines dünnen Magenschlauchs direkt in den Ventrikel gespritzt wurde. Alle Belastungen bei Ratten sind also ausnahmslos per os vorgenommen worden.

Was die zu verabreichende Flüssigkeitsmenge anbetrifft, kann man einer Ratte von 200 g leicht 10—12 cm<sup>3</sup> einspritzen, aber auch 15 cm<sup>3</sup> werden noch gut vertragen. Grössere Ratten können entsprechend noch mehr erhalten.

Bei einiger Übung gelingt die Magensondierung sehr leicht. Am vorteilhaftesten hält eine Person die Ratte in Rückenlage, den Kopf nach hinten gestreckt, während ein Anderer den dünnen Schlauch, geschützt durch eine dünne Holzleiste, möglichst tief in den Oesophagus einführt und die Flüssigkeit mit einer gewöhnlichen Spritze einspritzt. Um die Sondierung zu erleichtern kann der Gummischlauch in etwas flüssiges Paraffin getaucht werden.

Bei richtiger Technik wurde ein Übergeben der eingespritzten Lösung bei den Ratten nie beobachtet.

Am 10. Versuchstage wurden die Ratten auf Diät II abends vor der Harnsammlung mit 12 g Glucose pro kg Körpergewicht belastet. Die Glucose wurde in 30 % Lösung verabreicht, sodass

eine Ratte von 250 g beispielsweise 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit erhielt (entsprechend 3 g Glucose). Das Gewicht der Ratten schwankte zwischen 190 bis 350 g, durchschnittlich 260 g. Nach der Belastung wurde wie bisher der Nachturin von 12 St. gesammelt.

Nach dieser starken Zuckerbelastung trat bei den Ratten starke Glucosurie ein, während der AK-Gehalt des Harns nicht verändert wurde. Die Diurese stieg etwas, aber nicht soviel als nach Verabreichung der grossen Flüssigkeitsmenge zu erwarten gewesen wäre. Das Harn-pH ging auf 6.8. — Die Ausscheidung der CS- und KGS schien nicht beeinflusst zu werden, dagegen waren der MS- und BTS-Wert ein wenig erhöht (vgl. Tabelle Nr. 18). —

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von Glucoseverabreichung auf die Harnzusammensetzung wurden noch einige Belastungsversuche mit steigenden Zuckermengen vorgenommen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle Nr. 22 zusammengestellt. Es wurde mit 5, 8, 12 und 15 g Glucose pro kg Körpergewicht belastet. Wie bei den weiter unten zu beschreibenden Belastungsversuchen wurde auch nach dieser oralen Verabreichung von Zucker der Harn von 24 Stunden gesammelt.

Bei allen derartigen Belastungsversuchen fand die Belastung früh morgens statt und der Harn wurde bis zum folgenden Morgen gesammelt. Trinkwasser erhielten die Ratten während der 24 Stunden nicht, jedoch wurde den Tieren zur Vermeidung des Hungers einige Scheiben Kohlrübe in den Glastrichter gegeben.

Wie aus der Tabelle Nr. 22 hervorgeht, wurde Glucosurie erst nach Verabreichung von 12 bzw. 15 g Glucose pro kg Körpergewicht beobachtet. Die Belastung mit Traubenzucker hatte dagegen keinen Einfluss auf die Ausscheidung der AK; auch die CS-Ausscheidung war bei allen 4 Versuchen nicht verändert. Dagegen schien die Ausscheidung von KGS leicht erhöht zu sein, obwohl die qualitative Hydrazonprobe in allen Versuchen negativ war. Es muss aber bemerkt werden, dass die KGS-Bestimmungen in sehr kleinen Harnmengen ausgeführt werden mussten, sodass die Werte eventuell etwas zu gross sein dürften.

*Bei den Harnuntersuchungen von Ratten auf zuckerreicher Kost und nach Belastung mit Glucose konnten also keine deutlichen Veränderungen in der Ausscheidung der KGS, CS, BTS, MS und der AK beobachtet werden, im Vergleich zu der Ausscheidung bei Ratten auf gemischter Kost.*



C. Eiweissreiche Kost: Diät III. (Tabelle  
Tabelle

Diät III. Eiweissreiche Kost (15 Ratten)										
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung in 12 St. pro Ratte in mg						
				KGS	CS	MS	BTS	Acce- ton in γ	OBS	
3	5.40	5.9	>60''	0.06	0.16	—	—	16.74	0.40	
	3.60	5.9	35'' >60''		0.50	—	—	16.40	0.40	
4	3.40	6.5	>60''	—	0.76	—	—	—	—	
	5.00	6.1	>60''		0.05	—	—	12.00	0.32	
5	3.70	6.0	>60''	0.23	0.06	—	—	8.14	0.31	
	5.20	6.0	—		—	0.07	—	—	15.34	0.26
	7.60	6.0	—		—	0.29	—	—	15.20	0.39
	12.00	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	5.13	—	—	0.17	—	—	—	—	—	
7	6.50	6.0	>60''	0.29	—	—	—	—	—	
8	5.53	6.0	>60''	—	—	—	—	—	—	
9	6.40	—	—	0.57	—	1.46	1.84	—	—	
10	7.67	—	—		0.22	2.10	1.54	—	—	
11	6.80	—	—	—	0.20	1.53	1.91	12.01	0.39	

Auf der eiweissreichen Diät wurden 15 Ratten gehalten. Die Harnuntersuchungen wurden am 3. Tage begonnen und 9 Tage fortgesetzt. — Die auffälligste Veränderung bei der Kaseinkost war die starke Zunahme der Diurese. In 12 Stunden schieden die Ratten durchschnittlich ca. 6 cm<sup>3</sup> aus gegen ca. 2 cm<sup>3</sup> bei gemischter Kost. Auch das Harn-pH schien bei dieser Kost etwas höher zu liegen, im Durchschnitt pH 6. Trotz der starken Zunahme der Diurese zeigte sich die Ausscheidung der KGS eher etwas vermindert gegenüber den Versuchen mit Diät I. Auffallend war aber besonders die Abnahme der CS-Ausscheidung; der Durchschnittswert betrug weniger als 0.2 mg. Dies ist umso bemerkenswerter

Nr. 19 und Übersichtstabelle Nr. 21).

Nr. 19.

Diät III A. Eiweissreiche Kost + NaHCO <sub>3</sub> (12 Ratten)									
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydrazon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg					
				KGS	CS	MS	BTS	Aceton in γ	OBS
3	3.83	7.1	50''—60''	1.21	3.50	—	—	10.53	0.97
	2.83	6.9	45'' 60''		2.51	—	—	10.14	0.72
4	4.67	7.4	25''—45''	1.87	7.94	—	—	11.68	2.65
	4.67	7.5	60''		6.42	—	—	14.24	1.77
5	4.17	7.2	—	3.15	6.88	—	—	13.55	1.57
	3.83	7.2	—		7.86	—	—	13.98	2.10
6	5.33	—	—	3.15	3.71	—	—	—	—
	4.00	—	—		2.72	—	—	—	—
7	4.50	7.6	30''—40''	3.15	2.92	—	—	—	—
	4.40	7.7	25''—45''		1.86	—	—	—	—
8	3.10	7.5	30''—50''	3.15	7.75	—	—	4.44	1.13
9	4.20	—	—		—	1.65	0.05	—	—
10	5.70	—	—	—	8.55	6.16(?)	2.34(?)	—	—
11	7.00	—	—	—	3.68	1.41	0.75	12.60	1.01

als der Harn-pH eher eine leichte Erhöhung zeigte, welches zu einer Mehrausscheidung von CS führen sollte.

Bei der Eiweisskost wurden andererseits ziemlich hohe MS- und BTS-Werte gefunden, indem die Ausscheidung beider Säuren über 1.5 mg in 12 St. lag. Vielleicht ist dies durch eine starke Desaminierung von Aminosäuren, also einem Übergang von Eiweissbaustoffen in Zwischenprodukte des Zuckerstoffwechsels zu erklären. Auch die Aceton-Werte waren bei der Eiweisskost höher als bei den anderen Kostformen. Der Durchschnittswert betrug mehr als 13 γ gegenüber ca. 4γ normal. In den OBS-Werten war dagegen keine deutliche Veränderung zu beobachten.

D. *Fettreiche Kost: Diät IV.* (Tabelle  
Tabelle

Diät IV. Fettreiche Kost (15 Ratten)									
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg					
				KGS	CS	MS	BTS	Aceton in %	OBS
4	2.00	5.0	>60"	—	0.31	—	—	—	—
	1.70	6.8	>60"	—	0.27	—	—	—	—
5	1.20	6.6	—	—	0.11	—	—	—	—
	1.20		—	—	0.11	—	—	—	—
6	0.95	5.7	—	—	0.13	—	—	1.58	0.16
	3.00	6.2	—	—	0.30	—	—		
7	1.47	—	—	—	—	0.51	0.11	—	—
8	1.50	—	—	—	—	0.42	0.11	—	—
9	1.43	6.1	>60"	—	0.17	—	—	1.72	0.20
10	1.64	—	—	0.06	—	—	—	—	—
11	1.00	—	—		—	—	—	—	—
12	1.85	—	—	0.08	—	—	—	—	—
13	2.14	—	—		—	—	—	—	—
14	1.50	6.1	—	—	0.16	—	—	4.79	—
15	1.71	6.8	>60"	—	0.18	—	—	—	0.17

Als letztes Kostgemisch wurde schliesslich der Einfluss fettreicher Nahrung auf die Harnzusammensetzung untersucht. Auch zu diesem Versuch wurden 15 Ratten verwendet; die Harnuntersuchungen wurden am 4. Tag begonnen und 12 Tage lang fortgesetzt. — Bei dieser Diät war die Diurese normal, das Harn-pH schien etwas nach der alkalischen Seite hin verschoben zu sein, indem der Durchschnittswert 6.2 betrug. Dessen ungeachtet war aber die CS-Ausscheidung ebenso klein wie bei der eiweisreichen Kost.

Auch die KGS-, MS-, BTS- und AK-Werte waren bei dieser Diät am kleinsten. Die Acetonwerte schienen also vermindert zu sein, obwohl man theoretisch bei der extremen Fettkost eher eine leichte Zunahme der AK-Ausscheidung hätte erwarten können.

*Zusammenfassend kann über diese Harnuntersuchungen bei ver-*

Nr. 20 und Übersichtstabelle Nr. 21).

Nr. 20.

Diät IV A. Fettreiche Kost+NaHCO <sub>3</sub> (12 Ratten)										
Versuchsdauer in Tagen	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg						
				KGS	CS	MS	BTS	Aceton in γ	OBS	
4	1.33	7.6	5"—12"	—	4.24	—	—	—	—	
	1.17	8.4	10"—20"	—	3.18	—	—	—	—	
5	1.67	8.4	—	—	6.26	—	—	5.17	0.54	
	3.33	7.6	—	—	8.41	—	—			
6	3.00	7.6	—	—	11.50	—	—	9.53	0.92	
	3.33	7.7	—	—	9.71	—	—	5.88	3.12	
7	2.18	—	—	—	—	0.46	0.16	—	—	
8	4.18	8.0	—	—	7.95	—	1.24	0.24	—	
9	3.45	8.2	3"—7"	—	8.15	16.96	—	—	4.31	0.65
10	2.17	—	—	—	5.10	—	—	—	—	
	3.60	—	—	—	6.72	—	—	—	—	
11	5.83	8.4	—	—	10.84	—	—	—	—	
12	6.40	—	—	—	15.41	—	—	—	—	
	2.66	—	—	—	6.09	—	—	—	—	
13	4.60	—	—	—	12.09	—	—	—	—	
	4.00	—	—	—	7.11	—	—	—	—	
14	3.63	8.4	—	—	8.82	16.64	—	—	—	
15	2.36	8.1	2"—10"	—	10.42	—	—	10.27	4.18	

Tabelle Nr. 21.

Übersichtstabelle. Durchschnittswerte der Tabellen Nr. 17, 18, 19 und 20.

Diät	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	pH	Ausscheidung pro Ratte in 12 St. in mg					
			KGS	CS	MS	BTS	Aceton in γ	OBS
I .....	1.95	5.9	0.31	0.40	0.61	0.28	—	—
II ....	1.53	5.8	0.47	0.61	0.82	0.03	3.93	0.26
III .....	5.89	6.0	0.26	0.19	1.69	1.77	13.69	0.35
IV ....	1.62	6.2	0.07	0.19	0.47	0.11	3.70	0.18
I A	2.87	8.2	3.73	10.24	0.50	0.19	—	—
II A	2.41	8.2	3.83	9.88	0.52	0.40	3.27	2.57
III A	4.45	7.4	2.49	6.12	1.53	0.40	11.40	1.49
IV A	3.27	8.0	8.83	9.70	0.85	0.20	7.03	1.88

schiedenen Kostgemischen gesagt werden, dass die Nahrung bei Ratten nur einen sehr geringen Einfluss auf die Ausscheidung der KGS, CS, MS, BTS und der AK hat. Bei der Fett- und Eiweiss-reichen Kost scheint die Ausscheidung der KGS und CS vermindert zu sein. Bei der Eiweiss-reichen Kost tritt ausser einer starken Zunahme der Diurese eine deutliche Vermehrung der MS-, BTS- und Aceton-Ausscheidung ein.

Tabelle Nr. 22.

## Belastungsversuche mit Glucose bei Ratten.

Verabreichte Menge pro 1 kg Körpergewicht	Zahl d. Versuchs-tiere <sup>1</sup>	Harnmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Qualitative Proben			Ausfüllungszeit der Hydrazon-fällung in Sek.	Ausscheidung in 24 St. pro Ratte in mg				
			Nyl.	Laenge	Gerh.		Zucker	KGS	CS	Aceton in γ	OBS
5 g (30 cm <sup>3</sup> )	4	5.5	—	—	—	—	0	2.54	0.58	—	—
8 g (30 cm <sup>3</sup> )	5	5.0	—	—	—	> 60 <sup>z</sup>	0	1.06	0.50	—	—
12 g (40 cm <sup>3</sup> )	5	9.6	+	—	—	> 60 <sup>z</sup>	38.4	1.28	0.91	16.3	0.30
15 g (40 cm <sup>3</sup> )	5	5.4	+	—	—	> 60 <sup>z</sup>	151.2	2.00	0.39	8.1	0.16

<sup>1</sup> Das Durchschnittsgewicht der Versuchsratten betrug 170 g und schwankte zwischen 100—245 g.

## 2. Der Einfluss des Hungers.

Im Anschluss an die Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Nahrungsgemische auf die Harnzusammensetzung war es von Interesse den Harn bei absolutem Hunger der Tiere zu untersuchen.

Derartige Versuche liessen sich leicht mit Ratten anstellen. Es wurden 2 Serien zu je 15 Ratten untersucht. Jede Serie wurde in drei Käfige mit je fünf Ratten geteilt. In jeden Käfig kamen Ratten möglichst gleicher Grösse, um ein Auffressen der kleinere Tiere durch die Stärkeren zu vermeiden. Vor Beginn des absoluten Hungers wurden die Tiere 4—7 Tage auf der gemischten Kost (Diät I) gehalten. Der Harn wurde, wie in den vorhergehenden Versuchen, nachts gesammelt (12 St.), während die Tiere tagsüber in gewöhnlichen Käfigen waren. Der Harn von drei Käfigen wurde vereint und gemeinsam untersucht. Der absolute Hunger begann mit dem Tage 0, von dem an die Tiere nur noch Wasser erhielten.

Die Tiere eines jeden Käfigs wurden so lange auf Hunger gehalten bis eine von den fünf Ratten starb oder von den anderen gefressen wurde. Bei Serie I konnten alle Tiere 3 Tage lang und 10 Tiere 6 Tage lang auf

Inanition gehalten werden. Bei Serie II hielten alle Tiere es ebenfalls drei Tage lang aus, 10 Tiere noch einen Tag länger. Während des Hungers wurde der 12-Stundenharn von jeder Nacht untersucht. Ferner wurde der Harn auch vor Beginn des Hungers und andererseits nach Abschluss des Hungers untersucht.

Tabelle Nr. 23.

*Hungerratten-Serie I (absoluter Hunger, 15 Tiere).*

Versuchstag <sup>1</sup>	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Harn pH	Ausfällungszeit der Hydraxonfällung in Sek.	Ausscheidung in 12 St. in mg pro Ratte			
				KGS	CS	Aceton in γ	OBS
2 T. vor Beginn	2.13	—	—	}0.69	—	—	—
1 T. „ „	2.13	5.9	>60"		—	—	—
0 T. „ „	3.06	5.9	>60"		—	0.45	5.59
1 T. nach Beginn	1.13	6.0	45" >60"	—	1.24	19.44	0.31
2 T. „ „	1.17	6.0	28"—60"	—	1.23	21.06	0.44
3 T. „ „	1.00	6.0	25" >60"	—	0.39	22.50	0.30
4 T. „ „	2.40	6.1	45" >60"	}0.76	2.04	25.20	0.48
5 T. „ „	2.80	6.1	>60"		1.10	8.87	0.23
6 T. „ „	3.60	6.0	—		0.32	18.90	0.24
7 T. nach Nahrungsaufnahme	6.75	6.2	60"	—	0.84	7.59	0.23

<sup>1</sup> Die Ratten wurden zu je fünf Stück in drei getrennten Käfigen gehalten. Vor dem Versuch erhielten die Tiere ca. 1 Woche lang Grundkost I (vgl. Tabelle Nr. 16). Am Tage 0 wurde alle Kost weggenommen, dagegen konnten die Tiere, wie bisher, beliebig viel Wasser trinken.

<sup>2</sup> Vom 4. Tage an wurden nur noch 10 Ratten (in 2 Käfigen) untersucht, da in dem dritten Käfig eine Ratte gestorben und von den anderen verzehrt worden war.

<sup>3</sup> Der Versuch wurde abgebrochen, nachdem in jedem Käfig eine Ratte gestorben war.

Die Resultate sind in der Tabelle Nr. 23 (Serie I) und Tabelle Nr. 24 (Serie II) zusammengefasst. Die Gewichtsabnahme der Ratten während der Versuchsdauer war sehr gross: meist nahmen die Tiere um mehr als ein Drittel ihres Körpergewichts ab, ehe sie an Inanition zu Grunde gingen oder der Versuch wegen Auffressens einer Ratte durch die anderen abgebrochen werden musste.

Im Allgemeinen wird in der Literatur der Standpunkt vertreten, dass es im tierischen und menschlichen Organismus bei protrahiertem Hunger zu einer Art Acidose kommt, bedingt durch

Tabelle Nr. 24

*Hungerratten-Serie II (absoluter Hunger, 15 Tiere).*

Versuchstag <sup>1</sup>	Harnmenge in 12 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Ausscheidung in 12 St. in mg. pro Ratte		
		CS	MS	BTS
0 T. vor Beginn ..	2.20	0.48	0.53	0.22
1 T. nach Beginn..	0.60	0.41	—	—
3 T. „ „ ..	1.33	0.68	0.33	0.00
4 T. „ „ <sup>2</sup>	1.90	0.30	0.30	0.09
4 T. nach Nahrungs- aufnahme ....	1.60	0.25	—	—

<sup>1</sup> Versuchsanordnung wie in Serie I.

<sup>2</sup> Am 4. T. waren nur noch 10 Ratten auf absolutem Hunger. In dem dritten Käfig war eine Ratte gefressen worden.

eine Ansammlung von AK im Blut und in den Geweben. Längeres Fasten soll also zu einer Störung in der Verbrennung der Acetessigsäure und OBS führen, genau wie bei der Zuckerkrankheit, ohne dass aber Veränderungen im Zuckerumsatz vorliegen. So ist beispielsweise bekannt, dass beim Menschen schon nach einigen Stunden Fasten die Lange'sche Probe auf Acetessigsäure bzw. Aceton im Harn positiv ausfallen kann. Im Zusammenhang mit den Inanitionsversuchen schien es daher vor allem wichtig die AK-Ausscheidung während der ganzen Versuchszeit zu verfolgen, umso mehr als ich derartige Versuche nicht im Schriftum gefunden habe.

Andererseits war es von Interesse die CS-Ausscheidung während des Versuches zu verfolgen, da nach den Befunden von ÖSTBERG (1931) bei acidotischen Zuständen, vor allem bei Diabetes mit Acidosenigung, die CS-Konzentration des Harns sinkt, oft bis auf kaum nachweisbare Spuren der Säure. Auch KRUSIUS und VESA (1939) konstatierten bei einigen Fällen von unkompenzierter Diabetes sehr kleine CS-Werte. — Was die KGS-Ausscheidung bei Inanition anbetrifft, so schien es wahrscheinlich dass sie, wie in den Versuchen der folgenden Kapitel, in grossen Zügen der CS-Ausscheidung parallel verlief.

Bei der Hungerserie I (vgl. Tabelle Nr. 23) wurde täglich ausser dem Harn-pH und der Ausfällungszeit der Hydrazonfällung CS, Aceton und OBS bestimmt; ausserdem wurden einige kombinierte KGS-Bestimmungen ausgeführt. Bei der Serie II

wurde ausser CS auch MS und BTS einige Male bestimmt (vgl. Tabelle Nr. 24).

Bei der Versuchsserie I ist eine leichte Zunahme der CS-Ausscheidung während der ersten Hungertage zu verzeichnen. Sonderbarer Weise wurde die grösste CS-Menge an dem Tage ausgeschieden, an welchem der Harn die grösste Acetonkonzentration zeigte (4. Hungertag). In der Serie II waren dagegen keine deutlich erhöhten CS-Werte festzustellen. Jedoch kann auch von dieser Serie gesagt werden, dass die CS-Ausscheidung nicht im geringsten vermindert war, umso mehr als die Diuresis bei Serie II sehr klein war. — Auch das Harn-pH scheint bei den Hungertieren keine Neigung zu haben saurer zu werden, wie man es a priori annehmen möchte. Im Gegenteil sind die pH-Werte eher etwas nach der alkalischen Seite hin verschoben.

Trotz dieser Befunde lag aber bei den Hungertieren wenigstens eine leichte Acidose vor, wie aus der Zunahme der Acetonausscheidung zu ersehen ist. Schon nach dem ersten Hungertage stieg der Acetongehalt auf etwas das 4-fache des normalen Wertes und nahm während der folgenden 4 Tage stetig etwas zu, wenn auch verhältnismässig wenig. Am 2. Hungertage war die Probe von LANGE positiv, an den anderen Tagen wurde diese Reaktion leider nicht ausgeführt. Nach dem 5. Tage wurden die Acetonwerte im Harn, ebenso wie die CS-Werte wieder kleiner. Offenbar erreichten die Tiere allmählich eine Art «*vita minima*-Zustand» mit möglichst geringer Verbrennung körpereigener Substanzen.

Trotz der deutlich erhöhten Aceton-Werte war die OBS-Ausscheidung nur sehr unbedeutend vermehrt, ein Umstand der auch dafür spricht, dass bei den Tieren keine starke Acidose, im Sinne der Stoffwechselstörungen bei schwerer Zuckerkrankheit, vorlag. Die GERHARDT'sche Probe war während des ganzen Versuchs negativ.

Was die MS- und BTS-Ausscheidung anbetrifft (vgl. Serie II, Tabelle Nr. 25), scheint sie bei den Hungerratten abzunehmen. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass bei es bei längerem Fasten zu einer Hemmung der Verbrennungsvorgänge, also auch der Glycolyse, kommt. Endlich muss noch erwähnt werden, dass in der Ausscheidung der KGS keine sichere Veränderung zu konstatieren war. Leider konnte wegen der kleinen Diuresis der Hungertiere nur eine Bestimmung während des Hungers ausgeführt werden und zwar aus dem Sammelharn des 4., 5. und 6. Hungertages. Der erhaltene Wert war eher etwas erhöht; es lag also, genau wie bei der CS, trotz leichter Acidose keine verminderte Ausscheidung vor. — In der Hungerserie I war die qualitative Hydrazonprobe



einige Male leicht positiv; dies dürfte durch die Zunahme der AK im Harn zu erklären sein. Bekanntlich reagiert sowohl das Aceton als auch die Acetessigsäure mit Hydrazin genau wie andere Carbo-nylverbindungen.

*Zusammenfassend kann über die Hungerversuche gesagt werden, dass es nach längerem Fasten bei den Ratten zu einer Zunahme der Acetonausscheidung kommt. Die CS-Ausscheidung der Versuchstiere scheint trotz dieser Acidose nicht vermindert zu sein, eher scheint sie während der ersten Hungertage etwas zuzunehmen.*

### *Belastung mit Aceton.*

Im Anschluss an die Hungerversuche mag hier kurz über zwei Belastungsversuche mit Aceton berichtet werden. Diese Versuche wurden nicht vorgenommen um eine künstliche Acidose bei den Ratten hervorzurufen — bekanntlich handelt es sich ja bei acidotischen Zuständen um eine Anhäufung von Acetessigsäure und OBS — sondern um die Wirkung eines starken Zellgiftes auf die Nieren und die Harnzusammensetzung zu untersuchen.

Das Aceton wurde in beiden Versuchen in Mengen von 8 g pro kg Körpergewicht, gelöst in 40 cm<sup>3</sup> Wasser, den Ratten auf gewöhnliche Art per os verabreicht. Zu jedem Versuch wurden vier Ratten verwendet. Bei beiden Versuchen gingen im Verlauf von 24 Stunden 50 % der Ratten ein, während die anderen Tiere am Leben blieben. Die gegebene Menge kann also als maximale Grenzdosis für Ratten angesehen werden.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle Nr. 23 verzeichnet. Die Verabreichung des Acetons hatte keinen Einfluss auf das Harnvolumen; dies dürfte gegen eine stärkere Schädigung der Nieren

Tabelle Nr. 25.

*Belastungsversuche mit Aceton, 8.0 g pro kg Körpergewicht der Ratten.  
(8 g Aceton gelöst in 40 cm<sup>3</sup> Wasser).*

Zahl der Ratten <sup>1</sup>	Harnmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Qualitative Proben			Ausscheidung in 24 St. in mg pro Ratte			
		Nyl.	Gerh.	Lange	KGS	CS	Aceton	OBS
4 <sup>2</sup>	3.0	—	—	+++	}0.17	}0.45	}350.6	}326.2
4 <sup>2</sup>	5.5	—	—	+++				

<sup>1</sup> Das Durchschnittsgewicht der Versuchsratten betrug 220 g und schwankte zwischen 150—270 g.

<sup>2</sup> Von 4 Ratten starben im Verlauf des Versuchs (nach ca. 8—24 St.) 2 Stück, d. s. 50 %. Die Harnwerte sind bezogen auf alle 4 Tiere.

sprechen. Die qualitative Proben auf Zucker (NYLANDER) waren, wie zu erwarten stand, negativ. Auch die GERHARDT'sche Ferrichloridreaktion fiel negativ aus. Die LANGE'sche Probe war dagegen stark positiv. Pro Ratte wurden in 24 Stunden ca. 350 mg unverändertes Aceton wieder ausgeschieden, welches ungefähr 15—20 % der verabreichten Menge entspricht. Sonderbarer Weise wurden aber auch stark erhöhte OBS-Werte gefunden. Ob dies wirklich durch eine Bildung von AK aus dem verabreichten Aceton zu erklären ist, mag dahingestellt bleiben.

In der Ausscheidung der KGS und CS war bei diesen Versuchen keine Veränderung zu konstatieren. —

### 3. Der Einfluss der Verabreichung reichlicher Alkalienmengen.

Die Wirkung der Überschwemmung des Organismus mit Alkalien auf die CS-Ausscheidung ist, wie in den vorhergehenden Kapiteln mehrfach hervorgehoben, ziemlich eingehend untersucht worden, vor allem von ÖSTBERG (1931). Auch in diesem Laboratorium haben SIMOLA und KOSUNEN (1938) bei der Belastung von Ratten mit Bicarbonat und SIMOLA und KRUSIUS (1939) bei entsprechenden Versuchen beim Menschen deutliche Zunahme der CS-Ausscheidung konstatiert.

Über den Einfluss der »Alkalosis« auf die Ausscheidung der anderen hier untersuchten Säuren liegen dagegen bisher wohl keine Untersuchungen vor. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Alkalien auf die Harnzusammensetzung auf zwei verschiedene Arten untersucht: 1) durch Belastungsversuche mit steigenden Alkalimengen und 2) durch Verabreichung von stark alkalischem Futter während längerer Zeit.

#### I. Belastungsversuche mit Alkalien.

Im Zusammenhang mit den in dem nächsten Kapitel berichteten Belastungsversuchen wurden zum Vergleich auch eine Reihe von Belastungen mit steigenden Mengen Bicarbonat ausgeführt. Diese Versuche zeigen, wie die einmalige Verabreichung grosser Mengen von Alkalien auf die Harnzusammensetzung wirkt, und es muss folglich schon hier auf sie eingegangen werden.

Die Belastungen wurden vor allem mit Natriumbicarbonat ausgeführt und zwar in steigenden Mengen mit einem Natriumgehalt von 300, 600, 900, 1200, 1500 und 1800 mg Natrium pro kg

Körpergewicht.<sup>1</sup> Diese Quantitäten wurden in zwei verschiedenen Versuchsserien Ratten von durchschnittlich etwa 200 g Gewicht verabreicht. Ferner wurde auch ein Belastungsversuch mit Soda, in einer Menge von 900 mg Natrium pro kg Gewicht, ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen Nr. 26 und 27 enthalten.

*Besprechung der Resultate:*

Tabelle Nr. 26.

*Belastungsversuche bei Ratten mit Alkalien.<sup>1</sup> Serie I.*

Verabreichte Substanz in g pro 1 kg Körpergewicht	Verabreichte Natrium-Menge pro 1 kg Körpergewicht in mg	Harnmenge pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Harn-pH	Ausfällungszeit der Hydratation in Sek.	Ausscheidung in 24 St. pro Ratte in mg			
					KGS	CS	Aceton in γ	OBS
NaHCO <sub>3</sub> 1.096	300	8.5	7.8	15"—60"	7.7	34.4	—	—
„ 2.192	600	12.5	8.5	10">60"	2.3	24.7	—	—
„ 3.288	900	12.5	—	8">60"	7.8	17.7	53.1	2.8
„ 4.384	1200	14.0	—	8"—60"	8.3	24.5	29.4	0.9
„ 5.480	1500	7.0 <sup>2</sup>	8.4	4">60"	0.6	0.8	—	—
„ 6.576	1800	5.75 <sup>2</sup>	8.6	15">60"	0.7	4.9	—	—
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.903	900	12.0	—	15">60"	3.5	16.1	39.6	1.9

<sup>1</sup> Bei allen Versuchen wurden 4 Ratten verwendet, mit Ausnahme des Belastungsversuchs mit 1200 mg Natrium, zu welchem 5 Tiere benutzt wurden. — Das Durchschnittsgewicht der Ratten betrug 205 g; die einzelnen Tiere wogen zwischen 125—335 g. — Die verabreichte Flüssigkeitsmenge pro 1 kg Körpergewicht betrug bei Belastung mit 300, 600, 1500 und 1800 mg Natrium (als NaHCO<sub>3</sub>) 50 cm<sup>3</sup>, bei den anderen Versuchen dagegen nur 30 cm<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Bei Belastung mit 1500 bzw. 1800 mg Natrium pro 1 kg Körpergewicht starben alle Tiere im Verlauf von 4—8 St. — 5.5 g NaHCO<sub>3</sub> pro 1 kg Körpergewicht muss also als Dosis letalis bei Ratten angesehen werden.

In Serie I (Tabelle Nr. 26) erwiesen sich Bicarbonatmengen, 1500 und 1800 mg Natrium pro 1 kg Gewicht entsprechend als stark toxisch, in dem alle Versuchstiere nach einigen Stunden eingingen. Der vor dem Tode gelassene Harn dieser Tiere enthielt Eiweiss und war zwar stark alkalisch, eine erhöhte KGS- und CS-Ausscheidung konnte aber nicht festgestellt werden. Auch die Dosis 1200 mg Natrium entsprechend zeigte noch etwas Giftwirkung. Alle

<sup>1</sup> Die Wahl gerade dieser Mengen erklärt sich durch die Belastungsversuche mit Natrium-äquivalenten Salzen verschiedener Säuren, über die weiter unten berichtet wird.

Ratten schienen nach 24 Stunden ziemlich mitgenommen und von der Serie II starb ein Tier von dreien. Der Harn enthielt geringe Spuren von Eiweiss. — Als sicher tödliche Dosis für Ratten ist also 5.5 g NaHCO<sub>3</sub> entsprechend 1500 mg Natrium pro 1 kg festzusetzen.

Bei der Durchsicht der Ergebnisse der Harnuntersuchungen ist die stark variierende Wirkung der Bicarbonatbelastung am auffälligsten. Bei allen Versuchen wurde der Harn deutlich alkalisch, jedoch war die KGS- und CS-Ausscheidung nicht immer gleichmässig erhöht.

In Serie I war eine sehr starke Alkaliwirkung, d. h. Zunahme der KGS- und CS-Werte zu konstatieren. Sonderbarer Weise war aber diese Alkaliwirkung bei der Dosis von 300 mg Natrium pro 1 kg am grössten und nahm mit steigender Dosis deutlich, wenn auch nicht ganz gleichmässig, ab.

Tabelle Nr. 27.

*Belastungsversuche bei Ratten mit Alkalien.<sup>1</sup> Serie II.*

Verabreichte Substanz in g pro 1 kg Körpergewicht	Verabreichte Natrium-Menge pro 1 kg Körpergewicht in mg	Harnmenge pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Harn-pH	Ausfüllungszeit der Hydratanz-fällung in Sek.	Ausscheidung in 24 St. pro Ratte in mg		
					KGS	CS	Aceton in γ
NaHCO <sub>3</sub> 1.096	300	15.3	8.0	>60"	1.1	1.5	51.1
• 2.192	600	12.3	8.5	>60"	1.2	8.9	10.6
• 3.288	900	12.3	8.5	>60"	0.6	9.7	19.7
• 4.384	1200 <sup>2</sup>	13.3	8.4	>60"	2.1	0.1	3.6

<sup>1</sup> Bei allen Versuchen wurden 3 Ratten verwendet. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 217 g; die einzelnen Tiere wogen zwischen 150—320 g. — Die verabreichte Flüssigkeitsmenge betrug bei allen Versuchen 50 cm<sup>3</sup> pro 1 kg Körpergewicht. — In allen Harnproben war die Albumin-Koehprobe schwach positiv.

<sup>2</sup> Bei Belastung mit 1200 mg Natrium pro 1 kg Gewicht starb eine der Ratten nach etwa 10 St.

In Serie II war dagegen die Zunahme der KGS- und CS-Ausscheidung nur sehr gering, obgleich die Diuresis stark vermehrt war und der Harn alkalisch reagierte. Die deutlichste Alkaliwirkung war hier nach Belastung mit 600 bzw. 900 mg Natrium pro 1 kg zu beobachten, während die Dosis von 1200 mg Natrium zu einer pathologisch kleinen CS-Ausscheidung führte.

Als Erklärung für diese paradoxe Wirkung wäre ich geneigt

eine toxische Wirkung der starken Bicarbonatlösungen auf die Ratten anzunehmen. Die stark alkalisch reagierenden Bicarbonatlösungen müssen schon auf die Schleimhaut des Magen-Darmkanals eine stark ätzende Wirkung ausüben. Hierdurch ist sicherlich die schlechte Verträglichkeit der Lösungen im Vergleich zu den im Folgenden zu beschreibenden Fütterungsversuchen mit alkalischer Kost zu erklären. Bei den letzteren dürfte es zu keinen stärkeren Schleimhautläsionen gekommen sein, obwohl die Tiere diese alkalische Kost während mehrerer Wochen erhielten, da das Bicarbonat nicht in gelöster bzw. ionisierter Form verabreicht wurde und dasselbe bei der allmählichen Lösung durch die Verdauungssäfte wenigstens teilweise durch die Magensalzsäure neutralisiert werden dürfte.

Für die Annahme einer toxischen Wirkung spricht ferner auch der Nachweis geringer Mengen Albumin in beinahe allen Harnproben, wie auch die Tatsache, dass die kleinsten Bicarbonatmengen (wenigstens in einem Versuch) die deutlichste Alkaliwirkung zeigten.

*Zusammenfassend ist über die Belastungsversuche mit Bicarbonat zu sagen, dass die einmalige Verabreichung von nicht toxisch wirkenden Mengen meist zu einer starken Zunahme der KGS- und CS-Ausscheidung führt, die in einzelnen Versuchen grösser sein kann als wie bei der Verfütterung von alkalischer Kost. (vgl. folgendes Kapitel).*

## II. Verfütterung von Bicarbonat mit der Kost.

Um den Einfluss stark alkalischen Futters während längerer Zeit eingehender zu beobachten, wurden gleichzeitig mit den Versuchen mit verschiedenen Kostgemischen (vgl. Kapitel III, 1) Parallelversuche unter Zusatz von Natriumbicarbonat zu den 4 Kostgemischen ausgeführt. Die Zusammensetzung der einzelnen alkalisierten Diäten geht aus der Tabelle Nr. 16 hervor.

Es wurden genau wie bei den Versuchen mit den normalen Kostgemischen folgende 4 Alkalidiäten verwendet: Gemischte Kost mit 7.5 % Bicarbonat (Diät I A), zuckerhaltige Kost mit 6.5 % Bicarbonat (Diät II A)<sup>1</sup>, eiweissreiche Kost mit 7.5 % Bicarbonat

<sup>1</sup> Bedingt durch einen Rechenfehler, der anfangs übersehen wurde, enthielt Diät II A nur 6.5 % Bicarbonat gegenüber 7.5 % bei den anderen Versuchen. Dieser Unterschied dürfte aber bei der langdauernden Verabreichung der alkalischen Kost keinen grösseren Einfluss auf die Ergebnisse haben, sodass die Harnuntersuchungen bei den verschiedenen Experimenten gut miteinander verglichen werden können.

(Diät III A) und fettreiche Kost mit 7.5 % Bicarbonat (Diät IV A).

Da diese Versuche mit alkalischer Kost gleichzeitig mit den Versuchen vorgenommen wurden, bei denen die Ratten auf den entsprechenden normalen Kostgemischen waren, sind die Ergebnisse der Harnbestimmungen zur Erleichterung des Vergleichs mit den Normalwerten in denselben Tabellen auf der rechten Halbsseite zusammengestellt (vgl. Tab. Nr. 17 gemischte Kost, Nr. 18 zuckerhaltige Kost, Nr. 19 eiweissreiche Kost und Nr. 20 fettreiche Kost). Ebenso sind in der Übersichtstabelle Nr. 21 die Durchschnittswerte der Harnanalysen nach Verfütterung der alkalischen Kostgemische angeführt.

Die Versuchsmethodik war im Übrigen die gleiche, wie bei den Untersuchungen in Kapitel III, 1. Für die Versuche mit jeder Alkalidiät wurden 10 Ratten verwendet. Die Tiere frassen die alkalische Kost im Allgemeinen nach kurzer Gewöhnung gern. Auffällig war, dass die Tiere viel mehr Wasser tranken als die Normalratten.

Im Grossen und Ganzen vertrugen die Ratten die alkalische Kost relativ gut. Zugrunde ging während der Versuche kein einziges Tier. Dagegen war nach einiger Zeit eine Gewichtsabnahme der Tiere festzustellen. Einige Ratten schienen auch Diarrhoe zu haben.

### *Besprechung der Resultate.*

A. *Gemischte Kost mit 7.5 % NaHCO<sub>3</sub>* (Diät I A; vgl. Tabelle Nr. 17 und 21).

Beim Vergleich der Harnuntersuchungen mit den entsprechenden Normaluntersuchungen muss festgestellt werden, dass die Diurese der Alkaliratten deutlich vermehrt war, durchschnittlich um etwa 1 cm<sup>3</sup> pro Ratte in 12 St. Das Harn-pH war während der ganzen Versuchsdauer stark alkalisch, durchschnittlich 8.2. — Am meisten fiel aber auf, dass die Hydrazonprobe, die im Normalharn immer negativ ausfällt, stets positiv war. Die Ausfällungszeiten der Hydrazonfällung waren beinahe ebenso klein, wie die von SIMOLA (1936, 1939) bei B-avitaminotischen Ratten beobachteten. Dementsprechend wurden auch immer deutlich erhöhte KGS-Werte im Harn gefunden. An einigen Tagen stieg die KGS-Ausscheidung pro Ratte in 12 St. über 5 mg. Die durchschnittliche KGS-Ausscheidung betrug während des Versuchs etwa 3.75 mg pro Ratte in 12 St., welches einer ungefähr 10-fachen Steigerung des Normalwertes entspricht.

Wie zu erwarten stand, stieg die CS-Ausscheidung während des Versuchs stark an. Die durchschnittliche Ausscheidung pro Ratte



Die Wirkung der eiweissreichen Alkalikost unterscheidet sich etwas von den übrigen alkalischen Diäten. Seltsamerweise wird die starke Diuresis der Tiere auf der kalciumreichen Kost durch den Alkalizusatz deutlich vermindert. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass das Bicarbonat die Wirkung der Eiweisskost teilweise aufhebt. Hierdurch liess sich auch erklären, dass der Harn bei dieser Diät längst nicht so alkalisch wird. Der Durchschnitts-pH-Wert betrug nur 7.4.

Sowohl die KGS- als auch die CS-Ausscheidung sind bei dieser Alkalidiät weniger stark erhöht als bei Diät I A und II A. Diese Tatsache scheint mit dem weniger alkalischen Harn-pH der Ratten auf dieser Kost in Zusammenhang zu stehen. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Werte in Tabelle Nr. 19 ist auch augenfällig, dass kleinere pH-Werte immer von einer geringeren CS- und KGS-Ausscheidung begleitet sind.

Die erhaltenen Ergebnisse stehen also gut im Übereinklang mit der von ÖSTBERG aufgestellten Theorie, dass die Grösse der CS-Ausscheidung nur von Verschiebungen im Säure-Basen-Gleichgewicht des Organismus abhängig sei. Es scheint aber aus den Versuchen auch hervorzugehen, dass ebenfalls die KGS-Ausscheidung im hohen Grade mit der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts verbunden ist.

Die MS-, BTS- und Acetonwerte sind bei den Tieren auf Diät III A ungefähr gleicher Grössenordnung wie bei den Vergleichstieren auf Diät III. Durchschnittlich scheinen aber die Acetonwerte etwas weniger erhöht zu sein als bei der einfachen eiweissreichen Kost.

D. *Fettreiche Kost mit 7.5 % NaHCO<sub>3</sub>* (Diät IV A; vgl. Tabelle Nr. 20 und 21).

Bei der fettreichen Alkalikost ist der Harn deutlich alkalisch, durchschnittlich beträgt das pH etwa 8.0. Die CS-Ausscheidung ist ungefähr ebenso gross wie bei Diät I A und II A. — Auffällig ist dagegen, dass die KGS-Ausscheidung bei diesem alkalischen Futter weitaus am grössten ist, durchschnittlich beinahe ebenso gross wie die CS-Ausscheidung. Bei den anderen Alkalidiäten betrug die KGS-Ausscheidung meist nur etwa ein Drittel der CS-Ausscheidung. — An einigen Tagen wurden KGS-Werte bis zu 15 mg pro Ratte in 12 St. gefunden.

Diese starke KGS-Ausscheidung lässt sich nicht ohne weiteres durch die Säure-Basen-Gleichgewichtstheorie erklären, da das Harn-pH eher kleiner war als bei Diät I A und II A und die CS-



Ausscheidung nicht grösser als bei den Ratten auf den anderen alkalischen Kostgemischen. Eine spezifische Wirkung der fettreichen Kost scheint aber auch nicht in Frage zu kommen, da die KGS-Werte bei den Vergleichstieren besonders klein waren.

Was die MS- und BTS-Werte bei den Tieren auf Diät IV A anbetrifft, konnte keine Veränderung beobachtet werden. Dagegen waren die Acetonwerte etwas grösser als bei den Vergleichstieren.

*Zusammenfassend ist über die Fütterungsversuche mit alkalischen Kostgemischen zu sagen, dass es bei den Ratten zu einer stark vermehrten CS- und KGS-Ausscheidung kommt. Bei eiweissreicher Kost ist die Alkaliwirkung am geringsten, während sie bei gemischter Kost, zuckerhaltiger Kost und fettreicher Kost ungefähr gleich stark ist. Jedoch führt die Belastung mit einer extremen Menge Traubenzucker zu einer starken Abnahme der Alkaliwirkung. — Bei fettreicher Alkalikost ist die KGS-Ausscheidung beinahe ebenso gross wie die CS-Ausscheidung, während sie bei den anderen alkalischen Kostgemischen nur etwa ein Drittel der letzteren ausmacht.*

#### **4. Belastungsversuche mit neutralen Natriumsalzen verschiedener organischer Säuren.**

In der Literaturübersicht wurde schon über die früher in diesem Laboratorium vorgenommenen Belastungsversuche von SIMOLA (1937, 1938)<sup>1</sup> berichtet. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden nun diese Untersuchungen fortgesetzt und auf eine grosse Zahl von organischen Säuren ausgedehnt. Über einen Teil der zu erst ausgeführten Experimente sind schon einige vorläufige Mitteilungen erschienen (SIMOLA und KRUSIUS, 1938; SIMOLA, KRUSIUS und ALAPEUSO, 1938; SIMOLA und KOSUNEN, 1938).

##### **A. Orientierende Belastungsversuche nebst Kochsalzkontrollversuchen.**

Die ersten einleitenden Belastungsversuche, mit denen bereits im Frühjahr 1937 begonnen wurde, wurden hauptsächlich mit BTS und MS ausgeführt. Anschliessend wurden dann aber auch Belastungen mit anderen physiologischen Verbindungen vorgenommen, die in naher Beziehung zu dem Umsatz dieser Säuren stehen. Von solchen Verbindungen kamen vor allen Dingen die KGS, die CS und die Aceton-bildenden Säuren in Frage; ferner aber

<sup>1</sup> Ein Teil der quantitativen Bestimmungen dieser Untersuchungen wurden bereits von dem Verfasser mitbearbeitet.

auch die im intermediären Stoffwechsel wichtigen C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren, wie z. B. die Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Fumarsäure.

Ehe ich auf die Ergebnisse der Belastungsversuche eingehe, muss ausser dem schon Angeführten noch einiges über die Methodik gesagt werden.

Aus rein praktischen Gründen wurden die Belastungsratten nicht auf der gemischten Kost (Diät I) gehalten, sondern die Tiere erhielten das in diesem Laboratorium gebräuchliche Futter der normalen Zuchtratten.<sup>1</sup> Zu diesem gehört vor allem eine Mehlspeise folgender Zusammensetzung:

Maismehl	.....	68.5 %
Weizenkleie	....	21.0 %
Kasein	.....	9.5 %
CaCO <sub>3</sub>	.....	0.5 %
NaCl	.....	0.5 %

Diese Mehlmischung wird mit Wasser zu einem festen Brei angerührt. Ferner erhielten die Ratten täglich schwarzes trockenes Hartbrot (»Knäckebrot«), öfters Milch, Mohrrüben, Kohlblätter oder Kohlrüben und einmal wöchentlich gekochte Lunge.

Diese Kost hatte im Vergleich zu den Ratten auf Diät I keinen Einfluss auf die Harnzusammensetzung, wie aus den Kontrollversuchen mit physiologischer Kochsalzlösung, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, hervorgeht.

Zur Ausschaltung jeglicher Fehlerquellen wurde der überwiegende Teil der Ratten nur einmal belastet. Bei der grossen Zahl der Versuche kam aber ein Teil der Tiere auch 2 oder dreimal zur Verwendung, jedoch nie früher als nach einer wenigstens 2 wöchentlichen Ruhepause.

Alle Rattenbelastungen wurden peroral vorgenommen. Die Methodik wurde schon oben beschrieben. Zu den Harnuntersuchungen wurde immer der Sammelharn von 24 St. benutzt.

Zu den ersten orientierenden Belastungen wurden versuchsweise verschiedene Mengen der Natriumsalze der oben erwähnten Säuren verwendet. Bei diesen Versuchen erhielten alle Ratten, unabhängig von ihrem Gewicht, dieselbe Menge verabreicht. Jedoch wurden, um gleichmässige und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, zu den Versuchen möglichst gleichgrosse Ratten benutzt. Das Durchschnittsgewicht der Tiere bei den einzelnen Versuchen betrug meist etwa 200 g.

Neben den eigentlichen Belastungsversuchen wurden anfangs auch Kontrollversuche ausgeführt, bei welchen Ratten entsprechender Grösse dieselbe Flüssigkeitsmenge in Form von physiologischer Kochsalzlösung erhielten.

Über die bei den Belastungsversuchen gebrauchten Verbindungen und die Herstellung der Lösungen muss noch folgendes angeführt werden:

<sup>1</sup> Dies war schon deswegen erforderlich, weil die aus weitgehendst gereinigten Nährstoffen zusammengesetzte Diät I sehr teuer kam.

Zu den Belastungen mit MS wurde 100 % sirupöses Na-Laktat als Ausgangspräparat verwendet. — Zu den BTS-Belastungsversuchen wurde das Na-Pyruvat auf folgende Art und Weise hergestellt: die 100 % BTS wurde frisch im Vakuum redestilliert zur Entfernung aller Kondensationsprodukte. Der Destillationsrückstand wurde meist zur Darstellung von Brenztraubensäurealdol verwendet. Nach der Destillation wurde die farblose BTS in Alkohol gelöst und mit gesättigter alkoholischer NaOH-Lösung unter Eiskühlung und fortwährendem Umrühren auf pH 7.0 neutralisiert. Hiernach wurde die weisse Fällung unmittelbar mit der Nutsche abgesaugt, wiederholt mit Alkohol gewaschen (bis der Alkohol nicht mehr sauer reagierte gegen Methylrot) und zuletzt mit absoluten Alkohol nachgespült. Die Fällung wurde dann in Löschpapier im Exsiccator über KOH bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Herstellung des Brenztraubensäurealdols wurden grössere Mengen Brenztraubensäure, die längere Zeit unter Einwirkung des Tageslichts bei gewöhnlicher Temperatur gestanden hatten und mehr oder weniger stark gelb gefärbt waren, im Vakuum destilliert. Der Destillationsrückstand wurde gemäss den Vorschriften von WOLFF (1901) und DE JONG (1901) im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, wobei sich ein Teil des Aldols auskristallisiert und sich ein gelb-braunes Öl absetzt. Dieses wird mit der Nutsche scharf abgesaugt, während die Kristalle getrocknet, mit Benzol gewaschen und schliesslich aus einem Gemisch von Äther und Benzol umkristallisiert werden. Das Öl kann noch zur Auskristallisierung weiteren Aldols im Vakuum-Exsiccator aufbewahrt werden. Das reine Aldol zeigte einen Schmelzpunkt von 115—117°, welches gut mit den Angaben in der Literatur übereinstimmte. Bei der Neutralisation entsprach der Alkaliverbrauch der theoretischen Menge, berechnet nach der von DE JONG angegebenen Formel des Aldols.

Zur Erhaltung grösserer Mengen des Aldols wurde vor der Vakuumdestillation, gemäss der Vorschrift von DE JONG, bisweilen zur Beschleunigung der Polymerisation trockener Chlorwasserstoff durch die BTS geleitet.

Die KGS wurde mir zu allen Versuchen von Prof. SIMOLA zur Verfügung gestellt. Sie war auf dessen Veranlassung mit gewissen Modifikationen nach den Angaben von WISLICENUS und WALDMÜLLER (1911) und BLAISE und GAULT (1911) aus Oxalbernsteinsäureester synthetisiert worden. — Das Präparat war gemäss der titrimetrischen Bestimmung mit Cerisulfat etwa 80 %.

Die Acetessigsäure wurde durch Umsetzung des Methylesters bei niedriger Temperatur mit Natriumhydroxid und anschliessender Neutralisation mit Salzsäure sowie Einengung im Vakuum über Schwefelsäure gewonnen.<sup>1</sup> Da die Lösung des Natriumsalzes der Acetessigsäure sehr schwach war, musste die Belastung der Ratten in zwei getrennten Gaben erfolgen.

Die KGS, die Fumarsäure, Bernsteinsäure und Äpfelsäure, ebenso wie

<sup>1</sup> Die Herstellung der Natriumacetessigsäurelösung wurde von Phil. mag. H. ALAPEUSO ausgeführt, wofür ich ihr meinen besten Dank sagen möchte.

der grösste Teil der anderen zu Belastungen verwendeten Verbindungen wurden als freie Säuren gewogen, in Wasser gelöst und unter Eiskühlung vorsichtig mit NaOH neutralisiert, wonach mit Wasser bis zum berechneten Volumen aufgefüllt werden musste. Meist wurde zur Neutralisation ein klein wenig mehr gebraucht als wie theoretisch berechnet war. Das pH der Belastungsflüssigkeiten war bei diesen Versuchen zwischen 6.5—7.0. — Einige andere Säuren wurden wiederum direkt als Natriumsalze gewogen, wie z. B. die MS, BTS, OBS, CS und mehrere in den späteren Belastungsversuchen verwendete Säuren.

### *Besprechung der Ergebnisse der ersten Belastungsversuche:*

Die Resultate sind in der Tabelle Nr. 28 zusammengestellt, in der die Belastungsversuche auf der linken Halbseite, die Kochsalzkontrollen dagegen auf der rechten Halbseite verzeichnet sind.

Bei den ersten Belastungsversuchen wurde das Hauptgewicht auf die Untersuchung der BTS- und MS-Ausscheidung gelegt. Daneben wurden aber auch schon eine ganze Reihe KGS- und CS-Bestimmungen vorgenommen.

#### *1. BTS- und MS-Belastungen.*

Bei den BTS-Belastungsversuchen wurden den Ratten Natrium-pyruvatmengen entsprechend 420—700 mg freier Säure verabreicht. KARCZAG (1917) hatte bei subcutaner Einspritzung gefunden, dass eine Dosis von 500 mg BTS bei Ratten von 150—200 g meist tödlich wirkte. Bei den im Zusammenhang mit dieser Arbeit vorgenommenen oralen Belastungen vertrugen die Tiere dagegen bedeutend mehr; 800 mg BTS bzw. 1000 mg brenztraubensaures Natrium erwies sich noch als gut verträgliche Dosis, wie aus den weiter unten beschriebenen Versuchen hervorgeht.

Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen von MAYER (1912) konnte in keinem Falle nach BTS-Belastung Glucosurie der Tiere festgestellt werden. Dies gilt auch für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Meerschweinchen- und Kaninchenversuche. Auch beim Menschen konnten SIMOLA und KRUSIUS (1939) keine Zuckerausscheidung nach Belastung mit BTS feststellen. Zu demselben negativen Ergebnis war, wie schon erwähnt, seinerzeit auch KARCZAG (1917) gekommen. Es liegt die Annahme nahe, dass die von MAYER verwendeten Pyruvatpräparate verunreinigt waren und dass die Zuckerausscheidung durch toxische Wirkung derselben hervorgerufen wurde. —

Tabelle  
Orientierende

V e r s u c h s r a t t e n						
Verabreichte Verbindung <sup>1</sup>	Menge in mg pro Ratte berechnet als freie Säure	Verabreichte Flüssigkeitsvolumen in cm <sup>3</sup> pro Ratte	Zahl der Versuchsratten	Harmmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Spez. Gewicht des Harns	Ausfüllungszeit der Hydraxonfällung in Sek.
milchsaures-Na. ....	700	3.5	4	10.5	—	30" > 60"
„ .....	875	3.5	5	3.0	—	25" — 60"
brenztraubensaures-Na. ..	420	3.5	4	3.0	—	10" — 20"
„ ..	560	3.5	2	5.0	—	5" — 20"
„ ..	560	3.5	2	1.8	—	1" — 10"
„ ..	700	3.5	2	6.0	—	5" — 17"
„ ..	700	3.5	2	4.0	—	3" — 15"
„ ..	700	3.5	3	9.0	—	4" — 20"
„ ..	700	3.5	4	9.3	—	4" — 25"
„ ..	534	4.0	9	8.8	1.040	2" — 27"
α-ketoglutar-saures-Na. ..	700	3.5	5	11.5	1.040	4" — 20"
„ ..	1125	7.5	5	15.0	1.043	4" — 45"
citronensaures-Na. ....	652	3.5	6	8.5	1.045	6" — 25"
„ .....	838	7.5	5	7.0	1.040	2" — 30"
bernsteinsaures-Na. ....	556	4.0	6	10.5	1.040	5" — 27"
„ .....	700	3.5	7	12.0	1.034	8" — 30"
fumarsaurcs-Na. ....	500	4.5	5	14.0	—	15" — 45"
„ .....	500	4.5	5	11.5	—	8" — 25"
„ .....	524	4.0	8	12.4	1.040	15" — 38"
i-äpfelsaures-Na. ....	700	3.5	7	9.0	—	10" — 25"
β-oxybuttersaures-Na. ..	495	4.0	6	6.2	1.045	6" — 35"
acetessigsäures-Na. ....	142	18.0 <sup>2</sup>	6	11.3	1.013	> 60"

<sup>1</sup> MS, BTS, CS und OBS wurden als Natriumsalze gewogen und in Wasser gelöst. Die übrigen Verbindungen wurden als freie Säuren gewogen, in Wasser gelöst und vorsichtig mit NaOH auf pH 6.5—7.0 neutralisiert.

<sup>2</sup> Die Acetessigsäure wurde durch Umsetzen des Methylesters gewonnen und in 2 getrennten Dosen verabreicht: zu Beginn 63 mg in 8 cm<sup>3</sup> und nach ca. 6 St. 79 mg in 10 cm<sup>3</sup>. Die Kontrollratten erhielten die entsprechenden Mengen Kochsalzlösung.

Nr. 28.

## Belastungs-Versuche.

Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg				Kontrollratten <sup>3</sup>									
				Zahl der Ratten	Harnmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Spez. Gewicht des Harns	Ausfällungszeit der Hydraxon- fällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg					
KGS	CS	MS	BTS					KGS	CS	MS	BTS		
—	—	3.70	15.33										
—	—	4.93	—										
—	—	1.02	0.50	2	2.5	—	> 60"	—	—	0.82	—		
—	—	1.02	1.19	2	7.0	—	> 60"	—	—	1.65	1.34		
—	—	1.15	1.04										
—	—	2.05	11.09	3	4.7	—	> 60"	—	—	1.59	0.93		
—	—	1.37	5.48										
—	—	2.28	2.65	3	1.5	—	> 60"	—	—	—	—		
—	—	2.06	2.53	3	4.7	—	> 60"	—	—	2.61	0.79		
4.9	17.3	7.04	8.59										
—	—	2.94	0.92	2	0.5	—	> 60"	—	—	—	—		
24.5	60.0	4.75	0.56										
9.8	—	2.03	0.78										
15.2	19.6	2.80	0.00										
33.4	36.8	3.47	0.97	5	7.2	1.036	> 60"	—	0.72	3.16	0.13		
—	—	2.20	1.70										
—	—	2.68	0.74										
14.8	—	2.01	1.83										
17.3	27.3	3.35	1.00	7	6.3	1.032	> 60"	1.2	0.76	2.75	0.78		
16.7	—	3.50	3.07										
13.0	30.9	—	—	8	2.5	1.059	> 60"	0.3	0.44	—	—		
0.2	10.0	3.66	0.01	6	6.3	1.028	> 60"	—	0.98	2.08	0.75		

<sup>3</sup> Die Kontrollratten erhielten das entsprechende Volumen 0.85 % NaCl-Lösung.

Die MS- und BTS-Ausscheidung nach BTS-Belastung war recht schwankend. Im Vergleich zu den Kochsalzkontrollratten wurden im Harn der Versuchstiere meist grössere BTS- und auch MS-Mengen gefunden, jedoch war die Steigerung im Hinblick auf die grossen verabreichten Gaben sehr gering. Auf die einzelnen Werte braucht hier nicht eingegangen zu werden (vgl. Tab. Nr. 28), ich möchte aber feststellen, dass selbst bei Belastung mit extremen BTS-Mengen der überwiegende Teil der Säure von den Tieren umgesetzt wird und nur ein Bruchteil im Harn wiederzufinden ist (maximal 1.5 % der verabreichten Säure).

Auch bei der MS-Belastungen konnte dieselbe Tatsache konstatiert werden, indem nur geringe MS-Mengen ausgeschieden wurden. In einem Falle war jedoch nach Belastung mit Laktat eine verhältnismässig stark erhöhte BTS-Ausscheidung zu verzeichnen.

Auffällig war bei den BTS-Belastungen vor allem der regelmässig deutlich positive Ausfall der Hydrazonprobe, welches nicht durch die relativ kleinen BTS-Werte bedingt sein konnte. Auf die KGS-Ausscheidung soll bei der Beschreibung weiterer BTS-Belastungsversuche näher eingegangen werden, es sei aber schon erwähnt, dass bei diesen ersten Versuchen in einem Fall ein etwa 10-fach vermehrter KGS-Wert konstatiert wurde. Bei den Laktatbelastungsversuchen war die Hydrazonprobe dagegen negativ oder höchstens ganz schwach positiv.

Was schliesslich die Ausscheidung der CS anbetrifft konnte in einem Falle nach Verabreichung von etwas mehr als 500 mg BTS ein stark erhöhter Wert gefunden werden. Die qualitativen Proben auf AK (GERHARDT und LANGE) waren in allen Versuchen negativ.

## *2. Belastungen mit den Natriumsalzen anderer Säuren.*

Auch bei Belastung mit KGS, CS, Bernsteinsäure, Fumar-säure, i-Äpfelsäure, OBS und Aacetessigsäure war im Vergleich zu den Normalratten, die physiologische Kochsalzlösung erhielten, kein Einfluss auf die Ausscheidung der BTS und MS festzustellen. Dagegen war bei all diesen einleitenden Belastungsversuchen, mit Ausnahme der Aacetessigsäurebelastung, eine stark positive Hydrazonprobe zu verzeichnen. Dem entsprechend war auch die KGS-Ausscheidung stark erhöht. Da diese Versuche nicht mit entsprechenden Mengen der einzelnen Verbindungen ausgeführt wurden, lässt sich auf Grund ihrer nicht entscheiden, welche Verbindungen den grössten Einfluss auf die KGS-Ausscheidung hatten. Auffällig war jedoch schon nach diesen ersten Versuchen, dass nicht nur nach Belastung mit KGS, sondern auch mit CS, OBS und

den wichtigen Dicarbonsäuren grosse Mengen KGS im Harn gefunden wurden, die bei weiten die durch die entsprechende »Alkaliwirkung« hervorgerufenen KGS-Ausscheidung überstiegen. Bei der Belastung mit KGS wurde von der verabreichten Säure ca. 2 % im Harn wiedergefunden, welches dafür spricht, dass auch diese Säure weitgehendst im tierischen Organismus umgesetzt wird.

Auch die CS-Ausscheidung war bei diesen Versuchen viel stärker erhöht, als wie durch die entsprechende Alkalimenge erwartet werden konnte. Die grösste CS-Ausscheidung wurde nach Belastung mit 1125 mg KGS gefunden, welches auch auf den nahen Zusammenhang der CS und KGS im tierischen Stoffwechsel hindeutet. — Die geringste CS-Ausscheidung wurde nach Belastung der Tiere mit Natriumcitrat festgestellt, wobei im Harn nur etwa 2 % der verabreichten Säure wiederzufinden war.

Zu erwähnen ist ferner noch, dass bei all diesen Belastungsversuchen die Acetonkörperproben im Harn negativ ausfielen. — Was speziell die Belastung mit Acetessigsäure anbetrifft, war keine starke Veränderung der Harnzusammensetzung festzustellen. Einzig die CS-Ausscheidung war etwas vermehrt, aber nur so viel als auch die verabreichte Alkalimenge bewirkt haben konnte. Dieser negative Ausfall des Versuchs dürfte teils durch die kleine verabreichte Dosis zu erklären sein; andererseits ist es aber auch möglich, dass bei der Umsetzung der Methylesters ein Teil der unbeständigen Acetessigsäure zersetzt wurde.

Bei dem grössten Teil der beschriebenen Belastungsversuche wurden im Harn neben der KGS auch Bernsteinsäurebestimmungen vorgenommen, wobei die wässrige Harnfraktion nach Ätherextraktion der Carbonylhydrazone weiter verarbeitet wurde. Bei keinem Belastungsversuch war eine stärkere Steigerung der Bernsteinsäure-Ausscheidung zu finden, wenn auch die erhaltenen Werte etwas schwankten.<sup>1</sup>

#### B. Belastungsversuche mit Natrium-äquivalenten Mengen der Natriumsalze.

\* Nachdem in den einleitenden Belastungsversuchen festgestellt worden war, dass eine grosse Anzahl physiologisch bedeutungsvoller Verbindungen Anlass zur Ausscheidung von KGS und CS geben, während die MS- und BTS-Ausscheidung nur unbedeutend

<sup>1</sup> In der Tabelle Nr. 28 sind die Bernsteinsäurewerte nicht angeführt, weil, wie schon erwähnt, die Bestimmungsmethode nicht ganz exakt ist und vor allem weil ein Teil dieser ersten Bestimmungen nur unter Vornahme einer Soxhletextraktion nach vorangehender Oxydation ausgeführt wurde, wodurch man zu grosse Bernsteinsäurewerte erhalten dürfte.



beeinflusst wird, war die nächste Aufgabe die Wirkung der Belastung mit verschiedenen grossen Mengen der einzelnen Säuren zu untersuchen. Vor allem schien es aber besonders wichtig zu erforschen, welche Säuren die stärkste Wirkung hervorriefen und ob dies in Bezug auf die KGS- und CS-Ausscheidung dieselben Verbindungen seien.

Da bei den Belastungen mit Natriumsalzen immer die »Alkaliwirkung«, die durch die verabreichte Natriummenge hervorgerufen wird, zu berücksichtigen ist, wurden die folgenden Versuche derart vorgenommen, dass die verabreichten Salze in ihrem Natrium-Gehalt gleich waren, und zwar erhielten die Tiere bei den einzelnen Versuchen pro Gewichtseinheit des Körpergewichts Natriumäquivalente Quantitäten der Salze. Solche Versuche wurden vor allem mit 600 und 900 mg Natrium (pro 1 kg Körpergewicht) entsprechenden Salzmengen ausgeführt. Daneben kamen aber auch einige Versuche mit Salzmengen, die 300 und 1200 mg Natrium pro 1 kg Gewicht entsprachen, zur Ausführung.

Bei den Belastungen mit Natrium-gleichen Salzmengen verschiedener Säuren wurde besonders die KGS- und CS-Ausschei-

Tabelle Nr. 29.

*Belastungsversuche mit den Salzen verschiedener Säuren in Natrium-äquivalenten Mengen. 300 mg Natrium pro 1 kg Körpergewicht der Ratten.<sup>1</sup>*

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis pro 1 kg Gewicht gewogen als		Harnmenge pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Ausfällungszeit der Hydratation in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St.		Bemerkungen
	Säure	Na-Salz			CS in mg	Aceton in γ	
Brenztraubens. Aldol	1.148		5.0	5"—10"	12.5	32.0	
Brenztraubensäure		1.226	6.75	—	—	56.7	
Gluconsäure . . . . .		2.636	4.75	15"—45"	4.7	28.7	Nylander —
Natriumbicarbonat <sup>2</sup>		1.096	8.5	15"—60"	34.4	—	KGS=7.7 mg
•		1.096	15.3	>60"	1.5	51.1	KGS=1.1 mg
Natriumchlorid . . . .		0.763	4.75	>60"	—	23.8	

<sup>1</sup> Zu allen Belastungsversuchen wurden 2 Ratten verwendet. Das verabreichte Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg Körpergewicht der Tiere betrug bei allen Belastungen 10 cm<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Die Bicarbonatbelastungsversuche sind die selben wie in Tabelle Nr. 26 und 27. Bei beiden Versuchen betrug das verabreichte Flüssigkeitsvolumen 50 cm<sup>3</sup> pro 1 kg Gewicht.

Tabelle Nr. 30.

Belastungsversuche mit den Salzen verschiedener Säuren in Natrium-äquivalenten Mengen. 600 mg Natrium pro 1 kg Körpergewicht der Ratten.<sup>1</sup>

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis pro 1 kg Gewicht gewogen als		Harmenge pro Ratte in 24 St. in cms	Ausfällungszeit der Hydratfällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St.		Bemerkungen
	Säure	Na-Salz			CS in mg	Aceton in γ	
Brenztraubens.Aldol	2.296		6.5	5"—10"	54.8	32.0	
Maleinsäure .....	1.513		6.5	10"—20"	11.4	—	
α-Ketoglutar säure..	1.875		4.0	10"—15"	12.3	—	
l-Äpfelsäure .....	1.748		6.0	15"—25"	13.1	—	
Bernsteinsäure ....	1.539		8.5	10"—15"	29.5	—	
β-Oxybuttersäure ..		2.871	9.0	30"—60"	9.0	—	
Aeonitsäure .....	1.514		8.0	10"—15"	26.3	48.0	
Brenztraubensäure .		2.452	7.5	—	—	39.0	
„		2.452	4.5	—	—	17.5	
„		2.452	4.0	10"—15"	10.2	—	
iso-Buttersäure ....		2.453	9.0	30">60"	8.1	—	
Malonsäure.....	1.357		10.5	10"—15"	54.2	—	
Fumarsäure .....	1.513		12.5	30"—50"	25.8	—	
Citraconsäure.....	1.654		5.0	10"—20"	26.9	53.0	
normal-Buttersäure.		2.453	10.0	>60"	14.5	—	
Oxalessigsäure (?) ..	1.700		4.0	10"—20"	6.7	—	
Glyeolsäure .....	1.983		9.5	>60"	14.0	—	
Crotonsäure .....	2.448		14.0	15"—30"	12.3	—	
Gluconsäure .....		5.272	9.0	10"—30"	5.6	54.0	Nylander +
Glutarsäure .....	1.635		4.5	5"—6"	44.3	19.5	
Adipinsäure .....	1.906		2.5	15"—30"	3.7	—	
Natriumbicarbonat <sup>2</sup>		2.192	12.5	10"—60"	24.7	—	KGS=2.3 mg
„		2.192	12.3	>60"	8.9	10.6	KGS=1.2 mg
Natriumchlorid ....		1.526	6.5	—	2.4	—	

<sup>1</sup> Zu allen Belastungsversuchen wurden 2 Ratten verwendet. Das verabreichte Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg betrug 10 cm<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Die Bicarbonatversuche sind die selben wie in Tabelle Nr. 26 und 27. Bei beiden Versuchen betrug das verabreichte Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg 50 cm<sup>3</sup>.

dung, sowie auch die AK-Ausscheidung untersucht; dagegen konnten nur ausnahmsweise MS- und BTS-Bestimmungen vorgenommen werden. Bei der Belastung mit 300 und 600 mg Natrium wurde nur die CS- und Aceton-Ausscheidung verfolgt. Da die Belastung mit 900 mg Natrium entsprechenden Mengen sich als

## Belastungsversuche mit den Salzen verschiedener Säuren in Natrium-äqui-

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis pro 1 kg Gewicht gewogen als		Verabreichtes Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg Gewicht in cm <sup>3</sup>	Anzahl der Ratten	Harmmenge pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Ausfallungszeit der Hydratanzfüllung in Sek.
	Säure	Na-Salz				
Brenztraubensäure-Aldol ..	3.445 <sup>1</sup>		30	4	8.75	1''—20''
Maleinsäure .....	2.270		30	4	15.0 (20.0) <sup>2</sup>	7''—50''
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure .....	2.183		10	4	9.75	4''—25''
l-Äpfelsäure .....	2.623		30	4	21.5	20''—40''
Bernsteinsäure .....	2.309		30	4	17.5	6''—40''
$\beta$ -Oxybuttersäure .....		4.306	30	4	23.75	3'' > 60''
Citronensäure .....		3.366	30	4	7.5	4''—16''
„ .....		3.366	30	5	6.0	7''—17''
„ .....		3.366	30	4	10.5	2''—25''
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COONa + 3H <sub>2</sub> O)	5.322	5.322	30	4	17.5	5''—60''
„		5.322	30	4	4.25 (8.5)	5''—30''
Acetondicarbonsäure .....	3.717		40	4	12.0	7''—17''
Aconitsäure .....	2.270		40	5	4.8	5''—15''
„	2.270		50	3	10.0	10''—35''
Brenztraubensäure .....		3.678	30	4	11.0	6''—24''
„		3.678	15	5	14.0	10''—24''
„		3.678	10	2	8.5	—
„		3.678	10	2	4.5	—
iso-Buttersäure .....		3,680	30	4	13.0	10''—30''
Malonsäure .....	2.035		20	4	5.5 (22.0)	5''—34''
Fumarsäure .....	2.270		30	4	14.0	3''—30''
Citraconsäure .....	2.540		30	4	12.5	50'' > 60''
l-Asparaginsäure .....	2.602		30	4	8.5	45'' > 60''
d,l-Asparaginsäure .....	2.602		30	4	8.0	25'' > 60''
Milchsäure .....		3,758	40	4	7.5	30'' > 60''
„		3,758	50	3	12.5	—
normal-Buttersäure .....		3,680	30	4	16.25	45'' > 60''
Oxalesigsäure (?) .....	2.551		40	3	7.0	1''—20''
Glutaminsäure .....	2.876		50	4	14.0	> 60''
$\beta$ -Glycerinphosphorsäure ..		4.228	50	5	13.0	5'' > 60''
Tartronsäure .....	2.346		40	5	6.0	> 60''
Mesoxalsäure .....	2.466		40	5	14.0	30'' > 60''
Glutarsäure .....	2.452		40	4	5.0	5''—30''
„	2.452		50	3	14.0	2''—10''
Adipinsäure .....	2.409		40	4	6.0	5''—40''
„	2.409		50	3	15.0	5'' > 60''
Natriumbicarbonat <sup>3</sup> .....		3.288	30	4	12.5	8'' > 60''
„		3.288	50	3	12.3	> 60''

<sup>1</sup> Alle als freie Säuren gewogenen Verbindungen wurden mit der berechneten NaOH-Menge (1.565 g. NaOH = 900 mg. Natrium) unter Eiskühlung vorsichtig neutralisiert.

<sup>3</sup> Die Biearbonatversuche sind dieselben wie in Tabelle Nr. 26 und 27.

Nr. 31.

valenten Mengen. 900 mg Natrium pro 1 kg Körpergewicht der Ratten.

Auscheidung pro Ratte in 24 St. in mg				Bemerkungen
KGS	CS	Aceton in $\gamma$	OBS	
34.3	59.9	43.8	0.9	
31.5 (42.0)	33.8 (45.0)	1965.0 (2620.0)	6.6	Lange +; 1 Ratte gestorben
18.2	36.6	19.5	—	
17.7	45.7	32.5	—	Simon-Piaux + (schwach)
17.7	39.4	96.3	9.5	
15.7	27.7	74.1	12.0	
15.1	47.3	—	—	
7.2 (?)	37.5	49.5	1.2	
—	52.5	10.4	19.4	
14.3	16.3	465.5	10.3	Simon Piaux+(schwach)
2.8 (5.6)	17.3 (34.5)	—	—	2 Ratten gestorben.
14.1	43.5	13104.0	9.4	Lange + + +;
13.6	42.0	—	—	
1.7	37.0	—	—	
13.1	42.3	36.3	0.9	
11.1	27.3	—	—	MS=6.62 mg; BTS=1.93 mg.
—	—	137.7	—	
—	—	36.0	—	
11.7	37.4	124.8	—	
11.6 (46.4)	18.1 (72.4)	—	—	{ Simon-Piaux+(schwach); 3 Ratten gestorben
9.3	20.1	16.9	—	
7.4	70.3	262.5	19.2	
4.9	16.7	19.6	10.0	
4.1	19.5	—	—	
—	14.2	—	—	MS=4.68 mg; BTS=1.71 mg
3.3	—	—	—	
3.2	31.5	152.8	—	
2.2	16.2	—	—	
1.7	15.8	—	—	pH=8.2
1.6	11.7	—	—	pH=7.5
1.5	7.7	—	—	
1.2	8.8	—	—	
Spuren	58.8	—	—	
•	65.8	—	—	
•	12.1	—	—	
•	17.6	—	—	
7.8	17.2	53.1	2.1	
0.6	9.7	19.7	—	

\* Bei Versuchen mit teilweise letalem Ausgang sind die in Klammern angegebenen Werte berechnet unter alleiniger Berücksichtigung der überlebenden Tiere.

Tabelle Nr. 32.

Belastungsversuche mit den Salzen verschiedener Säuren in Natrium-äquivalenten Mengen. 1200 mg Natrium pro 1 kg Körpergewicht der Ratten.

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis gewogen als Natriumsalz	Verabreichtes Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg Gewicht in cm <sup>3</sup>	Verabreichtes Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg Gewicht in cm <sup>3</sup>	Anzahl der Ratten	Mengen pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Ausfüllungszeit der Hydratation in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg			Bemerkungen
							KGS	CS	Aceton in γ	
Brenztraubensäure	4.904	30	4	10.0	2''—5''	5.8	50.0	38.0	OBS= 14.3 mg	
„	4.904	40	5	10.8	15''—40''	—	17.6	—		
„	4.904	40	4	12.5	14''—30''	12.7	35.5	—	MS= 15.5 mg	
Milchsäure .....	5.010	40	5	9.2	15''—35''	6.7	9.5	—	BTS= 3.1 mg	
Natr.bicarbonat <sup>1</sup>	4.384	50	5	14.0	8'' > 60''	8.3	24.5	29.4	OBS= 0.9 mg	
„	4.384	50	3	13.3	> 60''	2.1	0.1	3.6		

<sup>1</sup> Die Bicarbonatversuche sind dieselben wie in Tabelle Nr. 26 und 27.

am wirksamsten erwies, ohne dass diese Dosis im allgemeinen zu gross gewesen wäre bzw. toxisch gewirkt hätte, wurden mit dieser Quantität mehr Versuche gemacht als mit den anderen Mengen.

Die Ergebnisse dieser Versuche gehen aus den Tabellen Nr. 29—32 hervor. In der Tabelle Nr. 31 sind die verschiedenen Belastungen in der Reihenfolge der Grösse der ermittelten KGS-Ausscheidung geordnet. In den anderen Tabellen ist übersichtshalber dieselbe Reihenfolge beibehalten worden.

Vor jedem Belastungsversuch wurden die Versuchstiere zuerst gewogen, wonach sie die dem Gewicht entsprechende Flüssigkeitsmenge mit dem Magenschlauch erhielten. Zu den verschiedenen Versuchen kamen pro 1 kg Gewicht zwischen 10 bis 50 cm<sup>3</sup> Lösung zur Anwendung. In diesen Versuchsserien wurden die Kochsalzkontrollen fortgelassen, da, wie aus den ersten Versuchen hervorgeht, die Verabreichung der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung keinen Einfluss auf die Harnzusammensetzung hat. Jedoch wurden einige Belastungsversuche mit Kochsalz in natriumäquivalenter Menge ausgeführt. Vor allem wurden aber in jeder Versuchsreihe als Kontrollversuche Belastungen mit der dem Natriumgehalt nach entsprechenden Bicarbonatmenge vorgenommen, um die Grösse der Alkaliwirkung festzustellen.<sup>1</sup>

Um Raum zu sparen ist das Gewicht der Ratten bei den ein-

<sup>1</sup> Über diese Versuche wurde schon im Kapitel über die Alkaliwirkung berichtet; sie werden aber hier zum Vergleich nochmals angeführt.

Tabelle Nr. 33.

Übersichtstabelle über die CS-Ausscheidung bei Belastung mit Natrium-äquivalenten Mengen der Natriumsalze verschiedener Säuren (vgl. Tabelle Nr. 29, 30, 31 und 32).

Verabreichte Säure <sup>1</sup>	CS-Ausscheidung in 24 St. pro Ratte in mg Verabreichung von Salzmengen pro 1 kg entsprechend			
	300 mg Na	600 mg Na	900 mg Na	1200 mg Na
Brenztraubensäurealdol	12.5	54.8	59.9	—
Maleinsäure .....	—	11.4	33.8 (45.0)	—
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ....	—	12.3	36.6	—
l-Äpfelsäure .....	—	13.1	45.7	—
Bernsteinsäure .....	—	29.5	39.4	—
$\beta$ -Oxybuttersäure.....	—	9.0	27.7	—
Citronensäure .....	—	—	52.5	—
Essigsäure .....	—	—	17.3 (34.5)	—
Acetondiearbonsäure ..	—	—	43.5	—
Aeonitsäure .....	—	26.3	42.0	—
Brenztraubensäure ....	—	10.2	42.3	50.0
iso-Buttersäure .....	—	8.1	37.4	—
Malonsäure .....	—	54.2	18.1 (72.4)	—
Fumarsäure .....	—	25.8	20.1	—
Citraconsäure .....	—	26.9	70.3	—
l-Asparaginsäure .....	—	—	16.7	—
d, l-Asparaginsäure ....	—	—	19.5	—
Milchsäure .....	—	—	14.2	9.5
normal-Buttersäure ....	—	14.5	31.5	—
Oxalessigsäure (?) .....	—	6.7	16.2	—
Glutaminsäure .....	—	—	15.8	—
$\beta$ -Glyeerinphosphorsäure	—	—	11.7	—
Glyeolsäure .....	—	14.0	—	—
Crotonsäure .....	—	12.3	—	—
Glueonsäure .....	4.7	5.6	—	—
Tartronsäure .....	—	—	7.7	—
Mesoxalsäure .....	—	—	8.8	—
Glutarsäure .....	—	44.3	65.8	—
Adipinsäure .....	—	3.7	17.6	—
Natriumbicarbonat ....	34.4	24.7	17.2	24.5
„	1.5	8.9	9.7	0.1
Natriumchlorid .....	—	2.4	—	—

<sup>1</sup> Die Säuren sind in der selben Reihenfolge wie in den Tabellen Nr. 29—32 angeführt.

zelen Belastungen in den Tabellen nicht angeführt; ebenso wenig sind die einzelnen verabreichten Mengen verzeichnet. Diese Angaben dürften für die Beurteilung der Ergebnisse bedeutungslos sein, da zu allen Versuchen möglichst gleich grosse Tiere — durchschnittlich etwas über 200 g — verwendet wurden.

### *Besprechung der Ergebnisse.*

1. *Die CS-Ausscheidung.* (Vgl. hierzu ausser den Tabellen Nr. 29—32 besonders die Übersichtstabelle Nr. 33, in welcher die gesamten CS-Werte zusammengefasst sind, und die Abb. Nr. 1 mit der graphischen Darstellung der CS-Ausscheidung.)

Bei näherer Betrachtung der Tabelle Nr. 33 und der Abb. 1 ist besonders augenscheinlich, dass bei Belastung mit steigenden Salzmengen die CS-Ausscheidung in beinahe allen Fällen deutlich zunimmt. Die einzigste Ausnahme von dieser Regel bilden die Belastungsversuche mit Fumarsäure und Milehsäure, bei welchen die kleinere Dosis eine etwas stärkere Wirkung auf die CS-Ausscheidung hatte. Absolut genommen war aber die Wirkung beider Säuren sehr gering, sodass der kleine Unterschied auch innerhalb der Fehlergrenzen derartiger Versuche liegen kann. Andererseits scheint es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die grössere Dosis dieser Säuren (für Fumarsäure die 900 mg Natrium entsprechende Menge, für Milehsäure die 1200 mg Natrium entsprechende Menge) toxisch wirkte und zu einer Hemmung der CS-Bildung bzw. Ausscheidung führte.

Ebenso war auch, wie bereits besprochen wurde, die Wirkung der Belastung mit Natriumbicarbonat sehr variierend. In der ersten Versuchserie (300—1800 mg Natrium entsprechende Mengen) war ein relativ starker Effekt auf die CS-Ausscheidung zu beobachten, während in der zweiten Serie (300—1200 mg Natrium enthaltende Mengen) die Wirkung sehr minimal war. Bei diesen Versuchen wirkte die Dosis entsprechend 1500 und 1800 mg Natrium zweifellos toxisch, ebenso wie in einem Versuch die Dosis von 1200 mg Natrium, wodurch die abnorm kleinen CS-Werte nach diesen Bicarbonatmengen erklärt werden. Sonderbar war aber, dass in dem einen Versuch die Menge 300 mg Natrium entsprechend stärker wirkte als die grösseren Dosen.

Zur leichteren Übersicht der Wirkung der einzelnen verabreichten Verbindungen auf die CS-Ausscheidung lassen sich diese leicht in vier verschiedene Gruppen einteilen:

1. Säuren mit ganz besonders starker Wirkung auf die CS-Ausscheidung, pro Ratte in 24 St. mehr als 50 mg.

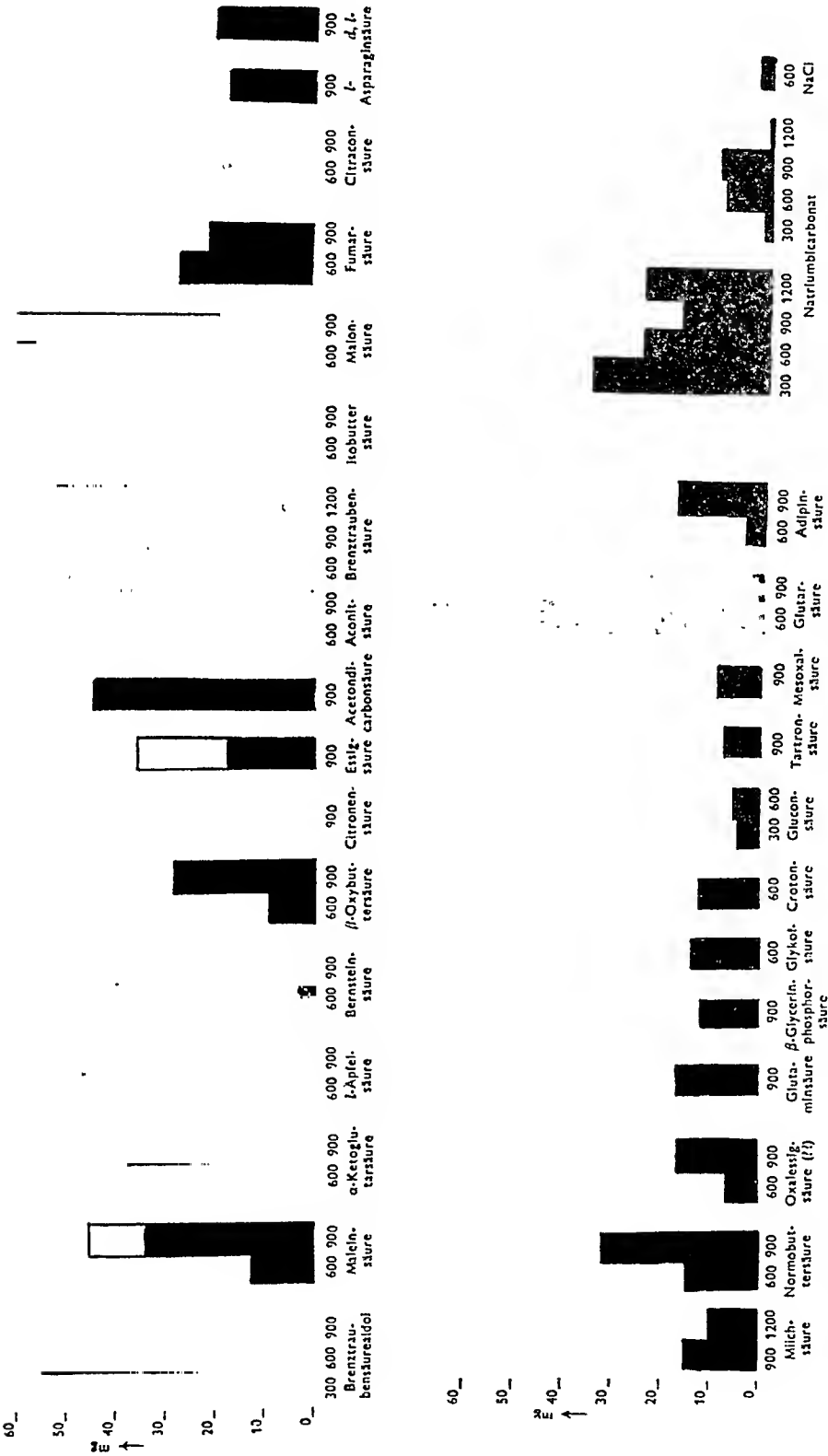


Abbildung Nr. 1.

Graphische Darstellung der CS-Ausscheidung nach Belastung von Ratten mit den Natriumsalzen verschiedener Säuren in Mengen von 300, 600, 900 und 1200 mg Natrium pro kg (vgl. Tabelle Nr. 33). Weise Säulen = CS-Ausscheidung nach Verabreichung toxischer Mengen, berechnet auf die den Versuch überlebenden Ratten.



2. Säuren, die zu einer deutlich vermehrten CS-Ausscheidung Anlass geben. Ausscheidung zwischen 50—25 mg CS pro Ratte in 24 St.
3. Säuren, deren Wirkung innerhalb der Grenzen der Alkaliwirkung (Bicarbonatwirkung) fällt. Ausscheidung 25—10 mg pro Ratte in 24 St.
4. Säuren ohne sicheren Einfluss auf die CS-Ausscheidung. CS-Werte kleiner als 10 mg.

Für diese Einteilung sind besonders die Belastungsversuche mit 900 mg Natrium enthaltenden Salzmengen herangezogen worden, weil mit dieser Quantität die meisten Versuche ausgeführt wurden und weil hier der Grössenunterschied in der Wirkung der einzelnen Verbindungen am deutlichsten zum Vorschein kommt.

Dieser Einteilung entsprechend gehören zu der ersten Gruppe die Natriumsalze folgender Säuren: Citraconsäure, Glutarsäure, Brenztraubensäurealdol, Malonsäure und auch die Citronensäure selbst. Erstaunlich ist hier vor allem die starke Wirkung der Citraconsäure (Methylmaleinsäure), die ziemlich allgemein, wie auch die Maleinsäure, als unphysiologisch angesehen wird. Nach den Untersuchungen von EMMRICH (1939) soll diese Säure grössten Teils wieder unverändert mit dem Harn ausgeschieden werden. Diese Frage konnte hier nicht untersucht werden; nach den Untersuchungen von HALLMAN stört aber die Anwesenheit von Citraconsäure bei der Bestimmung der CS nicht. — Auch die Wirkung der Glutarsäure auf die CS-Ausscheidung war erstaunlich gross, besonders im Hinblick auf den Umstand, dass diese Säure, keine stärkere KGS-Ausscheidung zu bewirken scheint. Auch wird die Glutarsäure zu einem grossen Teil wieder unverändert mit dem Harn ausgeschieden, worauf noch weiter unten eingegangen werden soll.

Beinahe denselben Effekt wie die beiden zuerst genannten Säuren hatte auch Brenztraubensäurealdol. Die CS-Ausscheidung nach Belastung mit einer 600 mg Natrium enthaltenden Menge betrug hier schon über 50 mg, während die Belastung mit einer grösseren Aldoldosis nur noch zu einer geringen Zunahme des CS-Wertes führte. Hier muss noch betont werden, dass weder die Brenztraubensäure noch ihr Aldol in Mengen, die in biologischen Substraten in Frage kommen, bei der Pentabromacetonmethode stören.

In diesen Versuchen war auch die Wirkung der Malonsäure, der ersten gesättigten Dicarbonsäure mit einer Methylengruppe, erstaunlich gross. KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) beobachteten bei intravenöser Einspritzung von Natriummalonat bei Kaninchen keine stärkere Zunahme der CS- und KGS-Ausschei-

dung, während die Bernsteinsäuremenge im Harn stark vermehrt war. Nach diesen Autoren wird die Malonsäure im tierischen Körper nicht umgesetzt und unverändert mit dem Harn ausgeschieden. Nach den Untersuchungen von QUASTEL und WOOLRIDGE (1929) und v. SZENT-GYÖRGYI (1937) scheint diese Säure ein Enzymgift zu sein da sie grosse Affinität zur Succino-Dehydrogenese zeigt. KREBS und Mitarbeiter erklären daher die Wirkung der Malonsäure durch eine Hemmung der Succinodehydrogenase, sowie der Enzymsysteme, die für den Umsatz der CS und der KGS nötig sind. — Diese Erklärung scheint gut übereinzustimmen mit den hier berichteten Versuchen, da bei Belastung mit Natriummalonat, 900 mg Natrium enthaltend, die Verbindung tatsächlich stark toxisch wirkte, indem 75 % der Tiere innerhalb von 24 St. nach der Belastung starben. Für diesen Versuch kann die pro Ratte ausgeschiedene CS-Menge nicht genau angegeben werden, da die Harnmenge pro Tier nicht bekannt ist. Die CS-Ausscheidung dürfte jedoch zwischen 18—72 mg liegen. Bei Belastung mit 600 mg Natrium enthaltender Menge war äusserlich keine toxische Wirkung auf die Tiere festzustellen und die CS-Ausscheidung betrug über 50 mg. Es scheint also, als ob bei Ratten diese giftige Säure besonders hemmend auf die die CS abbauenden Enzyme einwirke.

Auch nach Belastung mit Natriumcitrat wurde wenigstens in einem Falle eine CS-Ausscheidung von über 50 mg pro Tier gefunden, während die CS-Werte bei den anderen Citratbelastungsversuchen etwas niedriger waren. Bei dem Versuch mit der grössten CS-Ausscheidung (52.5 mg) hatten die Tiere durchschnittlich 472 mg CS (bzw. 661 mg Na-citrat) erhalten; es wurden also maximal etwa 11 % der Säure unverändert wieder mit dem Harn ausgeschieden.

Zu der zweiten Gruppe in Bezug auf die CS-Bildung gehören die Natriumsalze folgender Säuren: Brenztraubensäure, l-Äpfelsäure, Acetondicarbonsäure, Aconitsäure, Bernsteinsäure, iso-Buttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Maleinsäure, normal-Buttersäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Fumarsäure. Alle diese Säuren bzw. deren Natriumsalze geben Anlass zu einer CS-Ausscheidung, die stärker ist als die entsprechende Alkaliwirkung. Sie müssen also ebenso wie die Salze der Gruppe 1 irgendeinen Einfluss auf die Bildung oder den Abbau der CS im tierischen Stoffwechsel haben oder unter Umständen selbst Vorläufer der Säure sein. Weitaus an erster Stelle steht in dieser Gruppe die BTS, welche in ihrer Wirkung nur wenig hinter dem Aldol zurückbleibt. Dies ist umso beachtenswerter als beim Menschen nach Belastung mit BTS nur

eine der Alkaliwirkung entsprechende CS-Ausscheidung festzustellen ist, obwohl die verabreichte Menge eine etwa 40-fache Vermehrung der KGS-Ausscheidung hervorruft (SIMOLA und KRUSIUS, 1939). — Der starke Effekt der BTS im Rattenversuch steht im guten Einklang mit der CS-Cyklustheorie von MARTIUS und KNOOP und zeigt deutlich, wie auch viele andere Belastungsversuche, dass die CS-Ausscheidung nicht nur von der Alkaliwirkung bzw. dem Säure-Basen-Gleichgewicht abhängig ist.

Auch die in das Auf- bzw. Abbauschema der CS gehörenden C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren l-Äpfelsäure und Bernsteinsäure, hatten einen starken Einfluss auf die CS-Ausscheidung. Dagegen war die Wirkung der entsprechenden ungesättigten Säure geringer. Die Fumarsäure wirkte kaum stärker als die entsprechende Bicarbonatmenge; diese schwache Wirkung erklärt sich bei der oralen Belastung höchst wahrscheinlich durch die schlechte Löslichkeit der Fumarsäure. Es ist nämlich anzunehmen, dass die Säure durch die Magensäure wenigstens teilweise wieder ausgefällt wird, wodurch die Resorption verhindert wird. Sowohl ORTEN und SMITH (1937) als auch KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) erzielten bei intravenöser Verabreichung von Fumarat starke CS-Ausscheidung.

Die Maleinsäure hatte eine stärkere Wirkung auf die CS-Ausscheidung als ihre optische Antipode, die Fumarsäure. Bei Verabreichung von Natriummaleinat in Mengen entsprechend 900 mg Natrium starb aber von 4 Tieren eins, was auf eine toxische Wirkung hinweisen könnte. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Maleinsäure unphysiologisch ist und als Enzymgift wirkt. Der Effekt auf die CS-Ausscheidung wäre dann, wie bei der Malonsäure, durch eine Hemmung der abbauenden Enzymsysteme zu erklären. Jedoch soll die Maleinsäure nach den Untersuchungen von THUNBERG (1920) und LAKI (1935) im tierischen Gewebe umgesetzt werden. Ist dies der Fall, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Maleinsäure, ebenso wie die anderen Pflanzensäuren, direkt zur Bildung von CS Anlass gibt. In den referierten Versuchen von ORTEN und SMITH und KREBS und Mitarbeiter rief die Einspritzung von Maleinat ebenfalls eine starke CS-Ausscheidung hervor. — Es muss auf Grund all dieser Versuche konstatiert werden, dass die Verabreichung von Maleinsäure und besonders die Verabreichung ihres Methylderivats; der Citraconsäure, zu einer beachtenswerten CS-Ausscheidung führt, ohne dass bis aufs weitere der Wirkungsmechanismus dieser Säuren mit Sicherheit geklärt ist.

Auch die mit der CS chemisch nahe verwandten Säuren, wie

die Acetondicarbonsäure, die Aconitsäure und KGS riefen eine relativ starke CS-Ausscheidung hervor. Die Wirkung der Aconitsäure und KGS scheint im Hinblick auf das CS-Abbauschema von MARTIUS ohne weiteres klar. Dagegen ist der starke Effekt der Acetondicarbonsäure schwer zu erklären. Wie bereits dargestellt, wird heute allgemein die Ansicht vertreten, dass die Acetondicarbonsäure, wenigstens bei höheren Tieren, nicht als Abbauprodukt der CS in Frage kommt. Es bestand natürlich die Möglichkeit, dass diese Säure unverändert wieder mit dem Harn ausgeschieden und bei der Pentabromacetonmethode mitbestimmt würde. Hierfür schien vor allem der hohe Acetongehalt des Harns zu sprechen (Lange +++; Acetonausscheidung pro Ratte > 13 mg). Jedoch ist die Acetondicarbonsäure rein chemisch sehr unbeständig und dürfte bei der CS-Bestimmung, beim Kochen mit Schwefelsäure in Aceton gespalten werden. Nach 10 Minuten langem Sieden in saurer Lösung ist aber bestimmt das gesamte Aceton verdunstet. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass die starke Pentabromacetonreaktion tatsächlich nur durch CS hervorgerufen wurde. — Um festzustellen, ob der Harn unveränderte Acetondicarbonsäure enthielt, wurde ferner eine Parallellbestimmung vorgenommen, bei welcher das Kochen mit Schwefelsäure weggelassen wurde. Der derart ermittelte CS-Wert war aber sonderbarer Weise im Gegenteil kleiner als der auf gewöhnliche Art bestimmte CS-Wert. Hieraus dürfte deutlich hervorgehen, dass der Harn keine unveränderte Acetondicarbonsäure enthielt, da ja in diesem Falle bei der Kontrollbestimmung ein höherer CS-Gehalt im Harn hätte gefunden werden müssen als bei der Normalbestimmung.

Auch die iso-Buttersäure hatte einen deutlichen Einfluss auf die CS-Ausscheidung mit dem Harn, dagegen war sonderbarer Weise die Wirkung der gewöhnlichen Buttersäure und der OBS bedeutend kleiner, wenn auch stärker als die entsprechende Alkaliwirkung.

Zu der dritten Gruppe mit nur einer der Alkaliwirkung entsprechenden Steigerung der CS-Ausscheidung gehören eine ganze Reihe wichtiger intermediärer Stoffwechselprodukte: d,l-Asparaginsäure, l-Asparaginsäure, Essigsäure, Glycolsäure, Oxalessigsäure(?) Glutaminsäure, Milchsäure,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, Crotonsäure und Adipinsäure.

Von diesen muss jedoch das Ergebnis der Belastungsversuche mit Oxalessigsäure als sehr unsicher bezeichnet werden. Bekanntlich ist diese Säure in wässriger Lösung sehr unbeständig und wird leicht BTS abgespalten. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass

ein grosser Teil der Säure beim Lösen und Neutralisieren mit starker Lauge zerstört wird. Ferner muss auch erwähnt werden, dass das verwendete Oxalessigsäurepräparat (Enol-Oxalessigsäure) leider stark verunreinigt war.<sup>1</sup> Durch diese Umstände dürfte das ziemlich negative Resultat dieser Belastungsversuche zu erklären sein; theoretisch müsste die Oxalessigsäure im Tierversuch doch wenigstens ebenso stark auf die CS-Ausscheidung wirken wie die BTS. Tatsächlich hat HALLMAN (1939) mit Oxalessigsäure in-vitro in verschiedenen tierischen Geweben eine sehr starke, der l-Äpfelsäure gleichkommende, CS-Bildung erzielt.

Auch die d,l- und l-Asparaginsäure (Aminobernsteinsäure) hatte keine stärkere Wirkung auf die CS-Ausscheidung, obwohl aus dieser wichtigen Aminosäure im tierischen Stoffwechsel leicht durch oxydative Desaminierung Oxalessigsäure entstehen soll. Ebenso rief die Belastung mit Glutaminsäure keine die Alkali-Wirkung übertreffende CS-Ausscheidung hervor.

In dieser Gruppe ist besonders interessant die geringe Wirkung der im Kohlenhydratumsatz zentralen 3-C-atomigen Verbindungen. Nicht nur die  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, sondern auch die Milchsäure, die doch in naher Verbindung zur Brenztraubensäure steht, hatte keinen deutlichen Effekt auf die CS-Ausscheidung. Ebenso hatten diese Säuren keinen Einfluss auf die KGS-Ausscheidung, worüber weiter unten berichtet werden soll.

Ganz im Gegensatz zu den Befunden von FÜRTH, MINIBECK und EDEL (1934) hatte auch die Belastung mit Natriumacetat keinen deutlichen Einfluss auf die CS-Ausscheidung. In einem der Belastungsversuche mit 900 mg Natrium entsprechender Acetatmenge wirkte die Säure toxisch, indem 2 der Versuchstiere starben; die pro Ratte ausgeschiedene CS-Menge kann daher nicht genau angegeben werden (zwischen 17—34 mg). In einem zweiten Versuch überstanden die Tiere dagegen die Belastung mit derselben Menge; hierbei betrug die CS-Ausscheidung trotz grösserer Diurese der Tiere nur 16 mg. Auch die entsprechende Oxysäure, die Glycolsäure, hatte keine stärkere Einwirkung auf die CS-Konzentration des Harns. Von ungefähr derselben Grösse war auch die CS-Ausscheidung nach Belastung der Ratten mit Crotonsäure. Diese Säure, die dieselbe Struktur hat wie die Buttersäure, nur dass sie eine Doppelbindung enthält, ist bekanntlich sehr giftig und dürfte in biologischen Substraten nicht umgesetzt werden. —

---

<sup>1</sup> Die biologisch aktive Form der Oxalessigsäure ist übrigens die Ketoform; jedoch soll die Enolform in Lösungen in die Ketoform umgesetzt werden.

Schliesslich gehört in die Gruppe der Säuren mit einer der Alkaliwirkung entsprechenden CS-Ausscheidung auch die Adipinsäure. Die Unwirksamkeit dieser Säure ist verständlich, da sie ja nur zu ca. 50 % im tierischen Organismus abgebaut wird.

Zu der vierten Gruppe gehören drei Säuren, die so gut wie gar keine CS-Ausscheidung bewirkten, nämlich die Mesoxalsäure, Tartronsäure und Glueconsäure. Die beiden ersten Säuren, die Mesoxalsäure oder Ketomalonsäure und die Tartronsäure oder Oxymalonsäure, dürften giftig sein wie auch die Malonsäure selbst. Jedoch hatten sie im Rattenversuch nicht dieselbe Wirkung auf die CS-Ausscheidung. Alle Tiere überlebten die Belastung mit 900 mg Natrium enthaltenden Salzmengen, jedoch war die CS-Ausscheidung nur sehr gering. Eine Vergiftung der die CS abbauenden Enzyme dürfte daher nicht vorliegen. Vielleicht muss man annehmen, dass diese unphysiologischen Verbindungen völlig unzer setzt von den Nieren wieder ausgeschieden werden und daher keinen Einfluss auf die CS-Ausscheidung haben.

Die Unwirksamkeit der Glueconsäure zeigt genau wie die früher besprochenen Belastungsversuche mit Glucose, dass die gewöhnlichen Kohlenhydrate keine direkte Wirkung auf die CS-Bildung haben. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass ORTEN und SMITH (1937) bei ihren Versuchen nach Verabreichung von Lävulose eine deutliche, wenn auch nicht sehr starke Zunahme der CS-Ausscheidung beobachteten, während die Glucose auch in ihren Versuchen unwirksam war. Eine Erklärung des verschiedenen Verhaltens der Aldosen und Ketosen kann vorerst kaum gegeben werden.

In diesem Zusammenhange dürfte es angebracht sein etwas näher auf die des öfteren erwähnten Untersuchungen von ORTEN und SMITH (1937) einzugehen und die erhaltenen Ergebnisse zu vergleichen. Diese Autoren unternahmen ziemlich zahlreiche Belastungsversuche bei Hunden, denen die Natriumsalze in 100 mg Natrium entsprechenden Mengen intravenös eingespritzt wurden. Die stärkste Wirkung erzielten sie mit den Natriumsalzen der Malonsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Maleinsäure, die ja auch in den hier erläuterten Versuchen sehr effektiv waren. Die aller stärkste CS-Ausscheidung beobachteten diese Forscher nach Belastung mit Äpfelsäure. Belastungen mit Glutarsäure, Brenztraubensäurealdol,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, OBS, Acetondiearbonsäure, Aconitsäure, Brenztraubensäure, Citraconsäure wurden nicht ausgeführt. — Eine die Alkaliwirkung übersteigende CS-Ausscheidung wurde ferner von diesen Forschern beobachtet

nach Einspritzung von Buttersäure, Acetessigsäure, als Natriumsalz und Asparaginsäure als Bicarbonatverbindung; ausserdem war Lävulose effektiv. — Die Bicarbonatwirkung war bei den Versuchen mit Hunden relativ klein; ähnlicher Grösse war die Wirkung von Gluconsäure, Essigsäure, Glycolsäure, Milchsäure und Weinsäure als Natriumsalze und von Glycin (Aminoessigsäure), Glycerin, Glutaminsäure und Glucose als Bicarbonatverbindung. Kochsalz war ohne Wirkung. —

Die Resultate von ORTEN und SMITU stimmen also im Grossen und Ganzen mit meinen Untersuchungen über die CS-Ausscheidung überein; ebenso kamen, wie schon erwähnt, KRENS und Mitarbeiter (1938) in Bezug auf die wichtigen Dicarbonsäuren mit 4-C-Atomen bei Kaninchenversuchen zu ungefähr denselben Ergebnissen. —

2. Die KGS-Ausscheidung. (Vgl. hierzu die Tabellen Nr. 31 und 32 und die Abb. Nr. 2 mit der graphischen Darstellung der KGS- und CS-Ausscheidung nach Belastung mit 900 mg Natrium entsprechenden Salzmengen).

Nachdem im Vorhergehenden die Ausscheidung der CS nach Belastung mit verschiedenen Salzen auseinandergesetzt wurde, soll jetzt das Verhalten der KGS bei diesen Belastungen besprochen werden. Obwohl im Zusammenhang mit dieser Arbeit die Untersuchung der KGS-Ausscheidung viel wichtiger war als die der CS, konnten aus rein praktischen Gründen längst nicht so viel KGS-Bestimmungen vorgenommen werden. Zu jeder Bestimmung bedarf man nämlich, wie bereits erwähnt, einer grösseren Harnportion, während die CS meist aus 1 cm<sup>3</sup> oder aus einem Bruchteil eines cm<sup>3</sup>:s ermittelt werden kann. Daher wurde die KGS-Ausscheidung nur bei Belastung mit 900 mg Natrium enthaltenden Salzmengen vorgenommen, ebenso wie in einigen Fällen bei Belastung mit 1200 mg Natrium entsprechenden Mengen.

Auch hier wurden zum Vergleich KGS-Bestimmungen nach Belastung mit den entsprechenden Bicarbonatmengen ausgeführt. Die Alkaliwirkung auf die KGS-Ausscheidung ist geringer als auf die CS-Ausscheidung, jedoch stieg in einigen Belastungsversuchen die pro Versuchstier ausgeschiedene KGS nach Belastung mit 900 bzw. 1200 mg Natrium entsprechenden Mengen auf etwa 8 mg.

Im Allgemeinen kann beim Durchgehen der Resultate gesagt werden, dass all die Säuren — bzw. deren Natriumsalze — die eine deutliche Zunahme der CS-Ausscheidung bewirkten, auch einen Einfluss auf die KGS-Konzentration des Harns hatten. Jedoch war die absolute Grösse der KGS-Ausscheidung durchweg bedeutend

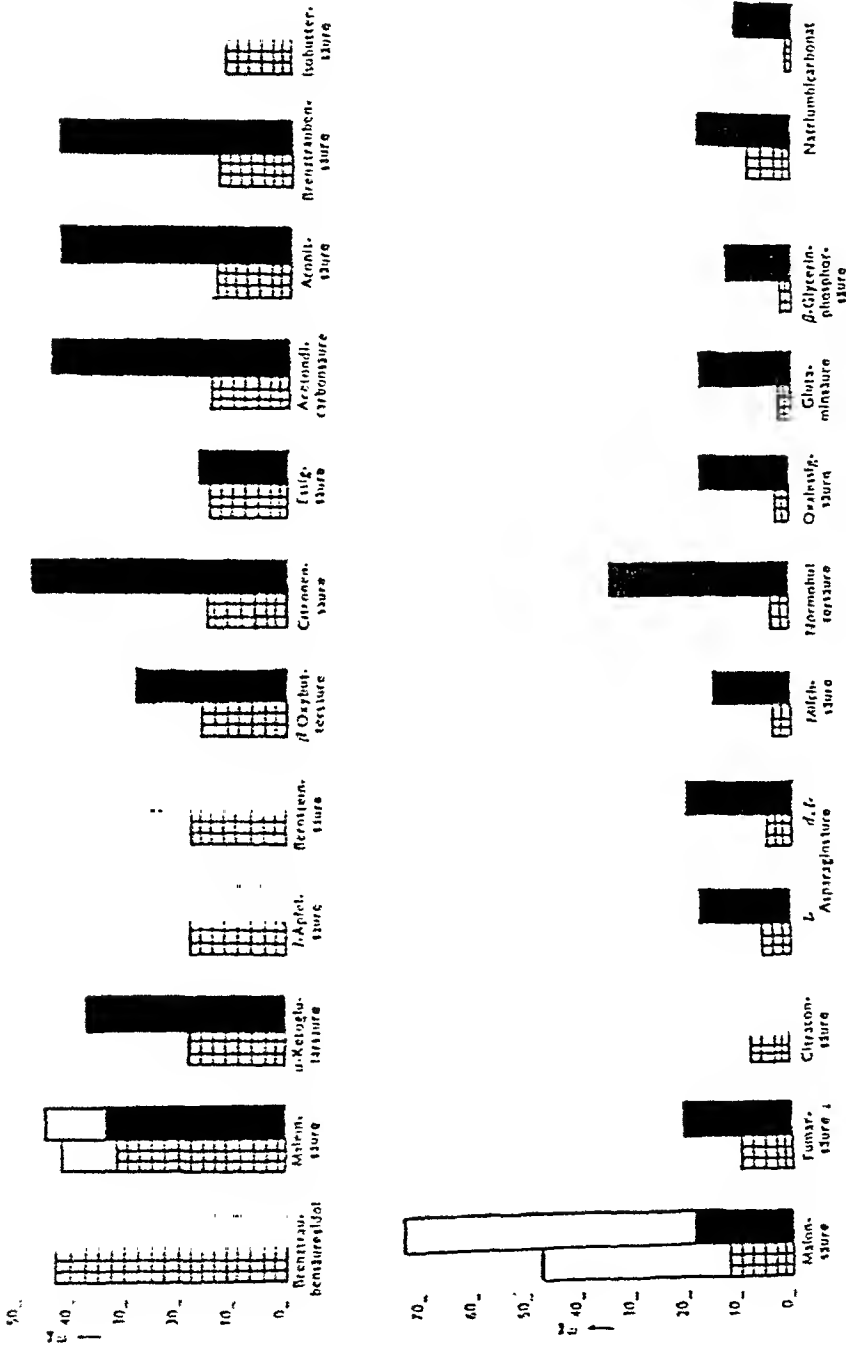


Abbildung Nr. 2.

Graphische Darstellung der KGS- und CS-Ausscheidung nach Belastung von Ratten mit Natriumsalzen in Mengen entsprechend 900 mg Natrium pro kg (vgl. Tabelle Nr. 31).  
 Gestrichelte Säulen = KGS-Ausscheidung.  
 Gefüllte Säulen = CS-Ausscheidung.  
 Weiße Säulen = KGS- bzw. CS-Ausscheidung nach Verabreichung toxischer Mengen, berechnet auf die den Versuch überlebenden Ratten.



kleiner als die der CS. Auch trat in dem Einfluss der verschiedenen Verbindungen keine so starken Unterschiede hervor, wie aus der graphischen Darstellung deutlich hervorgeht. Es ist daher nicht möglich die geprüften Verbindungen in Bezug auf ihren Effekt in mehrere Gruppen zu teilen; es reicht, wenn man die Säuren einteilt in solche, die eine stärkere Wirkung hatten als die entsprechende Alkalidosis, und solche, deren Wirkung der Alkaliwirkung entsprach oder noch kleiner war bzw. ganz fehlte.

Zu den Säuren, deren Natriumsalze eine deutliche KGS-Ausscheidung verursachten, gehören in Reihenfolge der Wirkungsgrösse folgende Verbindungen: Brenztraubensäurealdol, Maleinsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, l-Äpfelsäure, Bernsteinsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Citronensäure, Essigsäure, Acetondicarbonsäure, Acnitsäure, Brenztraubensäure, iso-Buttersäure, Malonsäure, Fumarsäure.

Von den angeführten Säuren hatten zwei bzw. vielleicht drei eine deutlich stärkere Wirkung als der Rest der Säuren. Dies waren Brenztraubensäurealdol, Maleinsäure und eventuell Malonsäure. Es handelt sich also tatsächlich um dieselben Verbindungen, die auch die grösste CS-Ausscheidung hervorriefen. Die einzigste Ausnahme bildet die Glutarinsäure, welche wohl keine KGS-Ausscheidung erzeugte; hierüber soll weiter unten berichtet werden.

Die KGS-Ausscheidung nach Belastung mit dem Aldol der Brenztraubensäure betrug etwas über 34 mg pro Tier, welches als sehr hohe Menge anzusehen ist. Die genaue Grösse der KGS-Ausscheidung nach Belastung mit Maleinsäure kann nicht angegeben werden, da, wie bereits erwähnt, eins der Tiere im Laufe des Versuches starb. Jedenfalls betrug die Ausscheidung wenigstens 31.5 mg eventuell aber bis 42 mg. Auch hier lässt sich nicht entscheiden, ob die Maleinsäure als spezifisches Enzymgift wirkte und eine Hemmung des KGS-Abbaus hervorrief, oder ob sie selbst Anlass zur Bildung von KGS gab. — Schliesslich schien auch die Malonsäure eine stärkere KGS-Ausscheidung zu verursachen. Bei der Belastung starben drei Ratten von vier, die KGS-Ausscheidung pro Tier betrug wenigstens 11.6 mg und maximal 46.4; der im Harn ermittelte KGS-Wert stieg auf 210.2 mg %. Die Stärke der Wirkung kann also nicht genau angegeben werden, ist aber auch von untergeordneter Bedeutung, da aus dem Versuch mit Sicherheit hervorgeht, dass die Säure stark toxisch wirkte und es sich also wohl nur um eine Hemmung des KGS-Abbaus handeln kann.

Alle übrigen wirksamen Säuren riefen eine kleinere KGS-Aus-

scheidung hervor und zwar wurde pro Versuchstier meist zwischen 20—10 mg KGS ausgeschieden. Am stärksten war noch die KGS-Ausscheidung nach Belastung mit der Säure selbst; hiernach erschien im Harn pro Tier 18.2 mg, welches 3.5—4.0 % der verabreichten Menge entspricht. Ebenso wie bei den orientierenden Versuchen wurde also der überwiegende Teil der verabreichten Säure umgesetzt.

Eine beinahe ebenso starke KGS-Ausscheidung bewirkten die Bernsteinsäure und deren Oxysäure, die l-Äpfelsäure, welche ja auch in Bezug auf die CS-Ausscheidung ziemlich gleiche Wirkung hatten. Die ungesättigte Fumarsäure bewirkte dagegen auch eine kleine KGS-Ausscheidung, sogar etwas unter 10 mg pro Tier.

Die KGS-Ausscheidung nach Belastung mit all den anderen angeführten Säuren lag in der Grösse so nah bei einander, dass es sich erübrigt die einzelnen Werte anzuführen. Erstaunlich berührte, dass die Belastung mit Brenztraubensäure keine deutlich grössere KGS-Ausscheidung hervorrief als zum Beispiel Essigsäure, Acetondicarbonsäure, Aconitsäure und iso-Buttersäure. War es doch SIMOLA gerade nach Belastung mit dieser Säure zum ersten Male gelungen, KGS im Harn der Ratten zu isolieren. Auch war die CS-Ausscheidung bei den BTS-Belastungen bedeutend höher als bei den anderen Säuren. Jedoch kann die recht stark positive Hydrazonprobe bei diesen Versuchen auch teilweise durch ausgeschiedene BTS bedingt werden.

Zu den in Bezug auf die KGS-Ausscheidung unwirksamen Verbindungen und denen, die eine der gleichen Bicarbonatmenge entsprechende Wirkung hatten, gehören die Natriumsalze folgender Säuren: Citraconsäure, l-Asparaginsäure, d,l-Asparaginsäure, Milchsäure, normal-Buttersäure, Oxalacessigsäure(?), Glutaminsäure,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, Tartronsäure und Mesoxalsäure. Wie man sieht sind es dieselben Säuren, die auch keine erhöhte CS-Ausscheidung verursachten. Nur die Essigsäure schien eine grössere KGS-Ausscheidung hervorzurufen, als wie auf Grund der CS-Werte erwartet werden konnte. Andererseits betrug die KGS-Ausscheidung nach Belastung mit Citraconsäure, die ja eine starke Erhöhung der Harn-CS verursachte, nur etwa 7 mg pro Ratte.

Was die Belastung mit Oxalacessigsäure anbetrifft, sei nochmals hervorgehoben, dass es unsicher scheint wieviel von dieser Säure die Versuchstiere tatsächlich erhielten. Da die KGS-Ausscheidung bei diesem Versuch sehr gering war, während die Hydrazonprobe stark positiv ausfiel, dürfte der Harn viel BTS enthalten haben.

In diesem Zusammenhang seien noch kurz die Belastungsver-

suche mit 1200 Natrium enthaltenden Salzmengen erwähnt. Derartige Belastungen wurden ausser mit Natriumbicarbonat nur mit MS und BTS ausgeführt. Sonderbarer Weise führte die grössere Dosis bei den Belastungen mit BTS weder zu einer stärkeren KGS- noch zu einer stärkeren CS-Ausscheidung. Im Allgemeinen waren die Tiere nach Belastung mit einer so grossen Menge stark mitgenommen, wenn sie auch nicht eingingen. Wahrscheinlich war schon die grosse Natriummenge nicht ohne Einfluss auf die Tiere, und es scheint als ob die grosse Dosis eine optimale Reaktion verhindere. Dem entsprechend wurde bei der Belastung mit MS über 15 mg wieder mit dem Harn ausgeschieden, während die BTS-Ausscheidung nur auf etwas über 3 mg stieg. Die KGS-Ausscheidung betrug bei demselben Versuch 6.7 mg pro Tier.

Alle im Vorhergehenden berichteten Befunde über die KGS-Ausscheidung basieren sich so gut wie ausschliesslich auf die quantitative Bestimmung der Säure nach der im methodischen Kapitel beschriebenen Methode. In einigen Fällen wurden auch Bernsteinsäurekontrollbestimmungen gemacht, sowohl aus der wässrigen Fraktion nach Ätherextraktion der 2.4-Dinitrophenylhydrazone als auch aus der Ätherfraktion des Harns, dem zur Kontrollbestimmung kein Hydrazin zugesetzt wurde. In keinem der geprüften Fälle konnte eine sichere Zunahme des Bernsteinsäuregehalts konstatiert werden, allerdings wurden längst nicht alle Belastungsurine hierauf geprüft. Diese Kontrollbestimmungen waren schon deswegen meist unausführbar, weil nicht genügend Harn für all die Bestimmungen vorhanden war. Einen grösseren Einfluss auf die KGS-Werte dürfte fernerhin selbst ein vermehrter Bernsteinsäuregehalt des Harns bei Extraktion mit nur einem Fünftel Volumen Äther kaum gehabt haben, da die Bernsteinsäure, wie erwähnt, unter den angegebenen Bedingungen nur sehr wenig in den Ätherauszug übergeht. — Schliesslich wurden die KGS-Werte immer aproximativ durch die Hydrazonausfällungsprobe kontrolliert.

Was speziell die Isolierung und Identifizierung der KGS im Harn nach Belastungsversuchen anbetrifft kann hier nur auf die früheren Untersuchungen von SIMOLA (1936—1939) hingewiesen werden. Dieser Forscher hat sowohl nach Belastung mit BTS (1937) als auch nach Belastung mit OBS (1938) im Harn der Ratten die KGS als 2.4-Dinitrophenylhydrazon isoliert und durch qualitative Proben, Schmelzpunktbestimmung, Alkaliverbrauch bei der Neutralisation und vor allem zahlreiche Mikroelementaranalysen verifiziert. Ebenso wurde von SIMOLA<sup>1</sup> auch die

<sup>1</sup> Nach persönlicher unveröffentllcher Mitteilung.

KGS nach Belastung mit Bernsteinsäure und Fumarsäure im Harn nachgewiesen.

Hier seien nochmals die von SIMOLA geprüften Eigenschaften der aus verschiedenen Belastungsharnen isolierten 2.4-Dinitrophenylhydrazonverbindung erwähnt.

1. Sie löst sich mit gelb-bräunlicher, ziemlich heller Farbe in 5 % Soda-lösung im Gegensatz zur entsprechenden Verbindung der BTS, die eine tief rote bis burgunderrote Farbe bildet.

2. Der Alkaliverbrauch der Verbindung bei der Neutralisation mit  $n/100$  NaOH ist bedeutend grösser als derjenige der entsprechenden BTS-Verbindung und entspricht ziemlich gut dem Alkaliverbrauch des 2.4-Dinitrophenylhydrazons der synthetischen KGS. z. B. verbrauchen:

10 mg reinstes 2.4-Dinitrophenylhydrazon der BTS  $3.70 \text{ cm}^3$  (theor.  $3.73 \text{ cm}^3$ )  
 10 mg synthetisches „ „ „ der KGS  $5.40 \text{ cm}^3$  (theor.  $6.14 \text{ cm}^3$ )  
 10 mg der isolierten Hydrazinverbindung meist ca.  $6.00 \text{ cm}^3$  oder etwas mehr.

3. Die wiederholt gereinigte und aus Äthylacetat umkristallisierte Hydrazinverbindung schmilzt meist bei  $223\text{--}224^\circ$ , welches dem Schmelzpunkt der synthetischen Verbindung entspricht. Ohne Auskristallisierung aus Äthylacetat liegt der Schmelzpunkt tiefer zwischen  $218\text{--}220^\circ$ .

4. Bei der Mikroelementaranalyse der isolierten Verbindung stimmt nicht nur der C- und H-Gehalt mit dem theoretischen gut überein, sondern auch der N-Gehalt. Ungenügend gereinigte Präparate enthielten dagegen meist 1—3 % N zu wenig.

Als weiterer Beweis dafür, dass es sich um KGS handelt, muss ferner angeführt werden, dass die Säure leicht durch Permanganat zu Bernsteinsäure oxydiert wird, wie im Zusammenhang mit der Ausarbeitung der quantitativen Methode gezeigt werden konnte. Die Bernsteinsäure kann dann als Silbersalz ausgefällt und identifiziert werden.

1. Man löst eine genau abgewogene Menge des Salzes in verdünnte Salpetersäure und titriert mit genau titrierter KSCN-Lösung gegen Ferriammoniumsulfat als Indikator. Aus der verbrauchten Menge der KSCN-Lösung kann der Silbergehalt der titrierten Salzmenge berechnet werden. Der theoretische Silbergehalt des Silbersalze der Bernsteinsäure beträgt 64.42 %; bei der Titrierung aus reinster Bernsteinsäure dargestellten Silbersalzes wurde der theoretische Wert gefunden. Die bei der KGS-Bestimmung als bernsteinsaures Silbersalz isolierten Fällungen stimmen in Bezug auf den Silbergehalt meist auffallend gut überein mit dem theoretischen Wert. Ist das isolierte Silbersalz nicht völlig rein und ganz weiss, werden bei der Titrierung etwas zu niedrige Silberwerte gefunden, aber nie unter 63 %. Zu beachten ist bei derartigen Bestimmungen ferner, dass das Silbersalz nicht dem Tageslicht ausgesetzt werden darf, da sich die Fällung sonst schwärzt durch Ausscheidung von freiem Silber oder Silberoxyd.

2. Nach den Vorschriften von ELLIOT und GREIG (1937) kann man aus dem Silbersalz auch die freie Säure herstellen und deren Schmelzpunkt prüfen. Die freie Säure erhält man durch Behandlung des Silbersalzes

mit Salzsäure und Entfernung der Silberchloridfällung oder durch Umsetzung mit Schwefelwasserstoff und Abfiltrierung des Silbersulfids. Nach mehrmaligen Eindunsten der Lösung kann dann die Bernsteinsäure in typischen Kristallen erhalten werden und durch Schmelzpunktbestimmung identifiziert werden (theor. Sp. 185°).

Wie schon hervorgehoben, wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit die KGS nur in einigen Ausnahmefällen als 2.4-Dinitrophenylhydrazinverbindung isoliert und durch qualitative Proben geprüft. Dagegen wurde des öfteren das bei KGS-Bestimmung erhaltene Silbersalz auf den Silbergehalt und den Schmelzpunkt der freien Säure untersucht. Meist erwies sich das isolierte Salz, besonders wenn in der Analyse grössere Mengen vorhanden waren, als gut übereinstimmend mit den theoretischen Werten für Bernsteinsäure bzw. deren Silbersalz. —

Anschliessend sei noch einiges über die KGS-Bestimmungen nach Belastung mit Adipinsäure und Glutarsäure berichtet. Bei der Ermittlung des KGS-Gehalts des Harns wurden aussergewöhnlich hohe KGS-Mengen gefunden, für Adipinsäure in zwei Versuchen 100 bzw. 85 mg pro Tier, für Glutarsäure 76 und 49 mg pro Tier. Dies war umso auffälliger als von der Adipinsäure speziell bekannt ist, dass sie nur schlecht abgebaut wird im tierischen Organismus. Nach den Untersuchungen von vor allem FLASCHENTRÄGER unterliegt diese Säure beim Abbau ferner der  $\beta$ -Oxydation, wobei zunächst Bernsteinsäure entstehen würde und nicht KGS. Es galt daher festzustellen, ob die im Harn bestimmte Säure tatsächlich KGS war, oder ob es sich eventuell um unverändert ausgeschiedene Adipinsäure oder um Bernsteinsäure handelte. Eine starke KGS-Ausscheidung nach Belastung mit Adipinsäure schien vorallem auch deswegen unwahrscheinlich, als die Hydrazonprobe sehr schwach ausfiel und der Harn auch nur relativ wenig CS enthielt.

Was die Belastung mit Glutarsäure anbetrifft, war die Hydrazonprobe meist etwas stärker und die CS-Ausscheidung nach Belastung mit dieser Säure, wie schon gezeigt, sehr hoch. Daher erschien eine starke KGS-Ausscheidung nicht ausgeschlossen. Denkt man aber an eine direkte Bildung von KGS aus Glutarsäure, müsste dies durch eine  $\alpha$ -Oxydation der Säure geschehen. Ein derartiger Oxydationsmechanismus dürfte bisher in der Biologie noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden sein. Wahrscheinlicher schien die  $\beta$ -Oxydation der Glutarsäure, analog der Adipinsäure, wobei Malonsäure entstehen würde. Die intermediär gebildete Malonsäure könnte dann ihrerseits zu einer vermehrten KGS- und CS-Ausscheidung Anlass geben.

Um diese Fragen näher zu klären mussten erstens die Silbersalze, die bei der KGS-Bestimmung erhalten wurden, auf ihren Silbergehalt durch Titrierung mit KSCN-Lösung (0.099-n) geprüft werden. Zu den Titrierungen wurden immer 50 mg der Silbersalze verwendet.

*Belastung mit Adipinsäure.* Theoretischer Silbergehalt des Silbersalzes der Adipinsäure 59.4 %.

50 mg reinstes adipinsaures Silbersalz verbr.	2.72 cm <sup>3</sup> KSCN	= 59.7 % Ag.
50 mg isoliert. Silbersalz (1. Belastungsvers.)	2.70 cm <sup>3</sup> »	= 59.3 % Ag.
50 mg » » (2. » )	2.65 cm <sup>3</sup> »	= 58.3 % Ag.

Wie aus der Untersuchung des Silbersalzes hervorging, stimmte der Silbergehalt auffallend gut mit dem theoretischen Gehalt des adipinsauren Silbersalzes überein. Der theoretische Silbergehalt der Bernsteinsäure beträgt dagegen 64.4 % Ag.

Zur weiteren Klärung der Frage wurde ein neuer Belastungsversuch mit adipinsaurem Natrium, in gleicher Menge wie bisher (900 mg Natrium), vorgenommen. Belastet wurden 5 Ratten, die durchschnittlich 455 mg der Säure erhielten. Der Sammelharn von 24 St. betrug 65 cm<sup>3</sup>, pro Tier wurden also 13 cm<sup>3</sup> ausgeschieden. Zur Isolierung der KGS wurde der filtrierte Harn mit demselben Volumen Wasser versetzt, wonach ein Fünftel Volumen der heissen Hydrazinlösung hinzukam. In 22 cm<sup>3</sup> Harn bildete sich selbst nach mehreren Minuten keine Hydrazonfällung, die von der Lösung hätte abgesaugt werden können.

Ferner wurden 12 cm<sup>3</sup> des Harns zur gewöhnlichen KGS-Bestimmung verwendet. Eine zweite gleichgrosse Harnprobe wurde zur Kontrolle genauso behandelt, aber ohne dass Hydrazinlösung hinzukam. Von beiden Proben wurden auch die Wasserfraktionen nach der Ätherextraktion weiter verarbeitet gemäss der Bernsteinsäurebestimmungsmethode (vgl. Kapitel II,2). Eine dritte Harnportion, 10 cm<sup>3</sup> wurde direkt ohne Ätherextraktion nach der Bernsteinsäuremethodik analysiert. Das Silbersalz, welches sich aus den verschiedenen Portionen ergab, wurde gravimetrisch bestimmt und titrimetrisch auf den Silbergehalt hin untersucht.

Folgende Mengen wurden erhalten:

Portion 1. Ätherauszug nach vorherigem Hydrazinzusatz: 178 mg Silbersalz, Silbergehalt 59.1 %.

Portion 2. Ätherauszug ohne vorherigen Hydrazinzusatz: 174 mg Silbersalz, Silbergehalt 59.3 %.

Portion 3. Wasserauszug nach Extraktion der Portion 1: 361.5 mg Silbersalz, Silbergehalt 59.8 %.

Portion 4. Wasserauszug nach Extraktion der Portion 2: 413.3 mg Silbersalz, Silbergehalt 59.8 %.

Portion 5. Gesamtharn ohne Hydrazin und Extraktion: 470.3 mg Silbersalz, Silbergehalt 59.3 %.

In allen Portionen stimmte der Silbergehalt auffallend gut mit dem theoretischen Gehalt des Silbersalzes der Adipinsäure überein. In den

wässrigen Auszügen war der Gehalt etwas höher; dies konnte eventuell durch Spuren von Bernsteinsäure verursacht werden. Auf Grund dieser Bestimmungen und der Tatsache, dass keine Hydrazonfällung isoliert werden konnte — dies geht auch aus der geringen Gewichts-differenz der Silbersalze der Portionen 1 und 2 hervor — scheint es sicher, dass die im Harn bestimmte Säure tatsächlich Adipinsäure war.

Rechnet man die Portionen 1 und 3 und ebenfalls 2 und 4 zusammen, kann man ebenso wie aus der Portion 5 den Gesamtgehalt des Harns an Adipinsäure berechnen:

Portion 1+3 = 539.5 mg Silbersalz	= 1825.3 mg%	Adipinsäure
Portion 2+4 = 587.3 mg	» = 1987.0 mg%	»
Portion 5 (10 cm <sup>3</sup> ) 470.3 mg	» = 1909.4 mg%	»

---

Durchschnitt = 1907 mg% bzw. 248 mg Adi-

pinsäure pro Ratte in 24 St. Mit dem Harn wurden also etwa 54.5 % der verabreichten Säure ausgeschieden. Diese Menge stimmt gut mit den in dem Schrifttum angegebenen Mengen überein.

Es kann nach diesen Untersuchungen konstatiert werden, dass die Belastung mit Adipinsäure zu keiner nachweisbaren KGS-Ausscheidung führt.

*Belastung mit Glutarsäure:* Theoretischer Silbergehalt des Silbersalzes der Glutarsäure 62.4 %.

50 mg reinstes glutarsaures Silbersalz verbraucht	2.80 cm <sup>3</sup> KSCN	= 61.5% Ag.
50 mg isoliert. Silbersalz (1. Belastungsvers.)	2.83 cm <sup>3</sup> »	= 62.2% Ag.
50 mg » » (2. »	2.78 cm <sup>3</sup> »	= 61.1% Ag.

Der Silbergehalt des isolierten Salzes schien hier, wenn auch die Unterschiede nur sehr gering waren, mehr mit dem Silbergehalt der Glutarsäure als wie mit dem der Bernsteinsäure übereinzustimmen.

Es wurde zur weiteren Prüfung der Frage ebenfalls ein dritter Belastungsversuch mit Glutarsäure ausgeführt. Belastet wurden 2 Ratten mit der 900 mg Natrium entsprechenden Menge des glutarsauren Natriums. Die Tiere erhielten durchschnittlich 545 mg der Säure. Das Harnvolumen betrug nach 24 St. 32 cm<sup>3</sup>, die Diurese pro Tier war also 16 cm<sup>3</sup>.

Aus 9 cm<sup>3</sup> Harn wurde wiederum versucht eine Hydrazonfällung zu isolieren, jedoch entstand im Verlauf von etwa 2 Minuten nur eine schwache Trübung.

Zweimal 8.8 cm<sup>3</sup> des Harns wurden wie bei der Belastung mit Adipinsäure gemäss den Portionen 1, 2, 3 und 4 untersucht. Eine Bestimmung aus dem Gesamtharn (Portion 5) fand nicht statt. Ergebnis der Analyse:

Portion 1. enthielt	49.4 mg Silbersalz,	Silbergehalt wurde nicht bestimmt.
Portion 2.	» 46.9 mg »	» » » » »
Portion 3.	» 298.1 mg »	» 62.0 % Ag.
Portion 4.	» 301.8 mg »	» 61.5 % Ag.

Auch bei diesen Bestimmungen stimmte also der Silbergehalt annähernd mit dem theoretischen Gehalt des Silbersalzes der Glutarsäure überein. Der geringe Unterschied der Silbersalzmengen der Portion 1 und 2 zeigt ebenfalls, dass der Harn praktisch keine KGS enthielt. Das aus den verschiedenen Portionen isolierte Silbersalz dürfte daher grösstenteils Glutarsäure gewesen sein.

Berechnet man die Gesamtausscheidung durch Addition von Portion 1 und 3 bzw. 2 und 4, erhält man:

Portion 1 + 3 = 347.5 mg Silbersalz = 130.7 mg Glutarsäure in 8.8 cm<sup>3</sup>

Portion 2 + 4 = 348.7 mg » = 131.1 mg » » »

Der Harn enthielt also etwa 1488 mg % Glutarsäure, welches 43.6 % der verabreichten Menge entspricht. In diesem Versuch scheint also die Umsetzung der Glutarsäure nicht viel grösser zu sein als die der Adipinsäure. Dagegen soll nach den Untersuchungen von BAER und BLUM nur ein geringer Teil der Glutarsäure wieder unverändert mit dem Harn ausgeschieden werden. Die Versuche dieser Forscher wurden an Hunden mit experimenteller Phlorizindiabetes vorgenommen.

Wie dem auch sei, zeigt der Kontrollbelastungsversuch mit Glutarsäure mit Sicherheit, dass die Ratten keine KGS mit dem Harn ausschieden. —

### 3. Die Acetonausscheidung. (Vgl. hierzu die Tabellen Nr. 29—32).

Ausser den KGS- und CS-Bestimmungen wurden im Zusammenhang mit den Belastungsversuchen mit Natriumäquivalenten Salzmengen verhältnismässig zahlreiche Acetonbestimmungen vorgenommen.

Wie in dem Kapitel über den Einfluss des Hungers auf die Acetonausscheidung gezeigt wurde, ist diese schon innerhalb physiologischer Grenzen recht schwankend und leicht beeinflussbar. Bei den Belastungsversuchen dürfte jedoch im Verlaufe von 24 St. eine direkte Inanitionswirkung auf die Acetonausscheidung kaum eintreten, besonders da die Tiere in den Glastrichtern immer etwas frische Kohlrüben oder Mohrrüben erhielten. Trotzdem muss man aber bei der Beurteilung der Acetonwerte vorsichtig sein und kleinen Schwankungen im Acetongehalt des Harns keine Bedeutung beilegen. Erst wenn die Acetonausscheidung pro Ratte in 24 St. deutlich über 100  $\gamma$  (0.1 mg) steigt, mag wohl eine Zunahme des Harnacetons vorliegen, die in Beziehung zu dem Belastungsversuch steht.

Setzt man etwa 100  $\gamma$  als obere Grenze der Acetonausscheidung fest, findet man bei den Belastungsversuchen nur in einigen wenigen Fällen eine Steigerung der Acetonausscheidung. Eine extrem starke Acetonurie rief nur die Belastung mit den Natriumsalzen



zweier Säuren hervor. Dies waren die Maleinsäure und die Acetondicarbonsäure, beide in Mengen entsprechend 900 mg Natrium. In beiden Fällen war die Acetessigsäure bzw. Acetonprobe von Lange stark positiv, dagegen war die Reaktion von Gerhardt negativ.

Wie bereits erwähnt, wirkte die Maleinsäure im Belastungsversuch etwas toxisch, es muss daher dahingestellt bleiben, wie die Erhöhung der Acetonausscheidung zu erklären ist. Pro Ratte wurden etwas 2—2.5 mg Aceton ausgeschieden, während der OBS-Gehalt des Harns wenigstens nicht vermehrt erschien. Die anderen wichtigen Dicarbonsäuren, besonders die 1-Äpfelsäure und die Bernsteinsäure hatten dagegen gar keinen Einfluss auf die Acetonwerte des Harns. Eine toxische Wirkung als Ursache der Zunahme der Acetonausscheidung nach Belastung mit Maleinat scheint daher am wahrscheinlichsten. Seinerzeit hatten BAER und BLUM (1907) bei Hunden mit Phlorizindiabetes keine Beeinflussung der Aceton-, Zucker- und N-Ausscheidung nach Belastung mit Malon-, Bernstein- und Brenzweinsäure (Methylbernsteinsäure) feststellen können. HUSZÁK (1935) dagegen beobachtete Acetonausscheidung nach Belastung mit Malonsäure. In den hier beschriebenen Experimenten wurde die Acetonausscheidung nach Belastung mit Malonsäure nicht untersucht.

BAER und BLUM (1906—07) und FRIEDMANN (1908) vertraten auf Grund von Leberdurchblutungsversuchen mit verzweigten Dicarbonsäuren die Ansicht, dass eine Acetonbildung aus diesen Säuren nicht in Frage käme, da die Carboxylgruppe gegenüber der Methylgruppe sehr fest zu haften schien. In meinen Versuchen rief die Citraconsäure (Methylmaleinsäure) nur eine geringe Zunahme der Acetonausscheidung hervor (pro Ratte etwas über 0.25 mg).

Die stärkste Acetonurie — über 13 mg pro Tier — wurde bei Belastung mit Acetondicarbonsäure beobachtet. Hier kann, wie schon erwähnt, nicht sicher entschieden werden, ob unzersetzte Acetondicarbonsäure mit dem Harn ausgeschieden wurde, oder ob tatsächlich ein Abbau der Säure zu Aceton stattfand. Ein Erhöhung der OBS-Ausscheidung war auch in diesem Versuch nicht festzustellen.

Eine deutliche Steigerung der Acetonausscheidung wurde auch nach Belastung mit Natriumacetat beobachtet (etwa 0.5 mg pro Tier). Dies stimmt gut überein mit der schon alten Auffassung, dass aus Essigsäure AK entstehen können (u. a. LOEB, 1912).

Intressant ist in diesem Zusammenhange besonders, dass die

Belastung mit Brenztraubensäure in Mengen entsprechend 300 bis 1200 mg Natrium pro kg, keine Steigerung der Acetonausscheidung bewirkte. Nur in einem einzigen Fall wurde ein Wert von etwas über 100  $\gamma$  erhalten. Bei den Belastungsversuchen vom Menschen mit Natriumpyruvat hatten SIMOLA und KRUSIUS (1939) dagegen eine ziemlich beachtenswerte Zunahme der Acetonausscheidung gefunden.

Auch der Aldol der BTS, welcher bekanntlich von vielen Forschern als Zwischenglied zwischen der BTS und den AK angesehen wird, verursachte bei den Rattenversuchen nicht die geringste Vermehrung der Acetonwerte. — Ebenso hatte die Belastung mit OBS keine Erhöhung der AK im Harn zur Folge. Eine leichte Steigerung schienen dagegen die iso- und die normal-Buttersäure hervorzurufen.

Zusammenfassend muss betreffs der Acetonausscheidung festgestellt werden, dass bei Ratten durch die meisten Säuren, die eine starke KGS- und CS-Ausscheidung verursachen, keine Zunahme des AK-Gehalt des Harns hervorgerufen wird. Die einzigen Ausnahmen bilden die Maleinsäure, Essigsäure und Acetondicarbonsäure.

### C. Belastungsversuche mit absolut gleichen Mengen verschiedener Säuren, verabreicht als Natriumsalze (vgl. hierzu die Tabelle Nr. 35).

Bei den bisher erläuterten Belastungsversuchen, die hauptsächlich mit Natrium äquivalenten Salzmengen ausgeführt wurden, war der Gesichtspunkt massgebend, dass die Verwendung eines konstanten Natrium- bzw. Alkaligehalts bei der Belastung die beste Möglichkeit zum Vergleich der Wirkungsgrösse der einzelnen Säuren biete. Andererseits schien es aber auch angebracht den Einfluss der verschiedenen Natriumsalze bei Belastung mit absolut gleichen Säuremengen zu vergleichen.

Derartige Versuche konnten jedoch nur mit einer beschränkten Zahl wichtigere Säuren ausgeführt werden. Eine Ausdehnung dieser Belastungsversuche auf all die bisher geprüften Verbindungen erübrigte sich im Verlauf der Arbeit auch deswegen, weil die Resultate sich im Grossen und Ganzen nicht von denjenigen nach Belastung mit Natrium gleichen Salzmengen unterschieden. Als wirksame Menge wurde zu den Belastungen 2.5 g der freien Säure pro kg Gewicht gewählt. Da das Gewicht der Ratten durchschnittlich etwa 200 g betrug, erhielten die Tiere meist 500 mg, berechnet als freie Säure bzw. entsprechend mehr der Natrium-

salze. Bei allen Versuchen wurden die Natriumsalze als 5%-Lösung, berechnet auf den Säuregehalt, verabreicht. Diejenigen Säuren, die nicht als Natriumsalze gewogen werden konnten, wurden wie in den früheren Versuchen mit starker Natriumhydroxyd-lösung vorsichtig bis pH 6.5—7.0 neutralisiert.

Tabelle Nr. 34.

*Belastungsversuche bei Ratten mit der gleichen Menge verschiedener Säuren, verabreicht als Natrium Salz. 2.5 g. Säure pro 1 kg Gewicht in 50 cm<sup>3</sup> (5 %-Lösung), neutralisiert mit starker NaOH ad pH 6.5—7.0.*

Verabreichte Säure (neutralisiert mit Natriumhydroxyd)	Mengenmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Ausfüllungszeit der Hydraxon- füllung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg				Bemerkung
			KGS	CS	MS	BTS	
Brenztrauben- säure-Aldol . . . .	10.0	3"—17"	8.2	36.0	5.4	sehr viel !!	pH=5.9
$\beta$ -Oxybuttersäure	13.75	10"—60"	1.5	21.8	4.8	0.2	pH=8.2
Bernsteinsäure ..	18.75 <sup>1</sup>	5">60"	13.2	40.4	5.3	1.0	spez.Gew. 1.029
„	12.5	5"—45"	8.9	30.3	4.6	1.7	„ 1.036
„ <sup>2</sup>	17.75	10">60"	18.7	17.8	4.2	2.3	pH=8.3
„ <sup>2</sup>	19.0	—	18.0	37.1	—	—	(nur 2 Tiere)
Fumarsäure . . . .	18.25	5">60"	4.8	26.5	5.0	4.6	spez.Gew. 1.029
„ . . . .	15.75	20">60"	4.8	52.0	8.3	—	„ 1.034
$\beta$ -Glycerinphos- phorsäure . . . .	8.0	5">60"	1.6	7.4	8.1	1.8	pH=7.1

<sup>1</sup> Die Belastungen wurden mit 4 Ratten pro Versuch angestellt, ausser der letzte Versuch, zu dem 5 Ratten verwendet wurden.

<sup>2</sup> Diese Versuch, sind auch in der Tabelle Nr. 35 enthalten.

Die Ergebnisse sind aus der Tabelle Nr. 34 zu entnehmen. Belastungsversuche wurden nur mit Brenztraubensäurealdol,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure ausgeführt. Neben der KGS- und CS-Ausscheidung wurde besondere Aufmerksamkeit auf die Verfolgung der MS- und BTS-Ausscheidung gerichtet.

Vergleicht man die Resultate dieser Belastungsversuche mit denjenigen bei Belastung mit 900 mg Natrium enthaltenden Salzmengen (Tabelle Nr. 31), bemerkt man durchweg eine erheblich schwächere Wirkung. Dies dürfte hauptsächlich dadurch zu erklären sein, dass bei den Belastungsversuchen mit gleichen Säure-

mengen eine kleinere Dosis verabreicht wurde. Andererseits ist aber auch nicht abzuleugnen, dass die Reaktionsstärke der Ratten bei den einzelnen Versuchen nicht immer gleich gross ist und dass die Menge der ausgeschiedenen Säuren natürlich auch bis zu einem gewissen Grade von der Grösse der Diurese abhängt. Diese »individuellen« Schwankungen bei den Rattenversuchen findet man schon beim Vergleich der Belastungsversuche mit denselben Säuren in Natrium äquivalenten Mengen, vor allem in Tabelle Nr. 31. Aber auch der Vergleich der ersten orientierenden Belastungsversuche (Tabelle Nr. 28) mit den Versuchen bei absolut gleichen Säuremengen (Tabelle Nr. 34) zeigt, dass die Belastung mit ungefähr entsprechenden Salzmengen eine ziemlich verschieden starke Wirkung haben kann.

Bei der Beurteilung der Resultate der Belastungsversuche darf man daher im Allgemeinen auf Grund eines einzelnen Versuches nicht zu weitgehende Schlüsse über die Wirkung einer Säure auf die Harnzusammensetzung ziehen; sind die Unterschiede in der Wirkungsgrösse bei Belastung mit verschiedenen Verbindungen nicht sehr gross, reicht es völlig aus festzustellen, ob ein deutlicher Effekt erzielt wurde oder nicht.

Beachtet man diese Vergleichsgrundsätze, unterscheiden sich die Harnbefunde nach Belastung mit der gleichen Säuremenge (Tabelle Nr. 34) prinzipiell nicht von den Resultaten bei den anderen Belastungsversuchen. In diesen Versuchen wurde nicht die stärkste Wirkung durch den Aldol der BTS erzielt, sondern die Belastung mit derselben Menge Bernsteinsäure führte sowohl zu einer grösseren KGS- als auch CS-Ausscheidung. Dies erklärt sich dadurch, dass bei Verabreichung natriumgleicher Mengen viel mehr Aldol gegeben wurde als Bernsteinsäure (etwa 700 mg gegenüber 460 mg pro Tier). Bei Verabreichung gleicher, absoluter Mengen scheint also die Bernsteinsäure wirksamer zu sein als der Aldol der BTS.

Die Hydrazonausfällungsprobe nach Belastung mit Aldol war stark positiv, während der ermittelte KGS-Wert (etwa 8 mg pro Tier) nicht so gross war. Dies erklärt sich dadurch, dass der Harn besonders viel Brenztraubensäure zu enthalten schien. Leider missglückte die BTS-Bestimmung, sodass die Grösse der Ausscheidung nicht angegeben werden kann.

Die Resultate der Belastung mit Bernsteinsäure und Fumarsäure entsprechen ziemlich gut denjenigen in Tabelle Nr. 31 und auch den orientierenden Belastungsversuchen; dies erklärt sich dadurch, dass bei allen Versuchen ziemlich gleiche Dosen verabreicht wurden.

Dagegen war die Wirkung der Belastung mit 2.5 g OBS pro kg viel schwächer als in Tabelle Nr. 31, wo die Tiere ungefähr 3.4 g der Säure pro kg erhielten. Die  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure war ebenso wie in den früheren Versuchen ohne stärkeren Einfluss auf die KGS- und CS-Ausscheidung.

Die MS- und BTS-Werte waren bei all diesen Belastungsversuchen etwas erhöht, jedoch konnte hier kein grosser Unterschied in der Wirkung der verschiedenen Säuren festgestellt werden. Am meisten erhöhten die MS- und BTS-Ausscheidung ausser dem Aldol die Fumarsäure und die Glycerinphosphorsäure. Die beiden zuletzt erwähnten Verbindungen stehen ja im Stoffwechsel in naher Beziehung zur BTS und auch zur MS. Trotzdem darf aber auf Grund dieser Versuche kaum auf einen direkten Übergang dieser Säuren in MS und BTS geschlossen werden.

Als wichtigstes Ergebnis obiger Versuche dürfte wohl die Tatsache angesehen werden, dass Brenztraubensäurealdol bei Belastung in absolut gleichen Mengen die Wirkung der physiologisch wichtigen Dicarbonsäuren auf die KGS- und CS-Ausscheidung nicht übertrifft. —

## **5. Belastungsversuche mit freien oder nur teilweise neutralisierten organischen Säuren.**

Belastungsversuche mit freien, nicht neutralisierten Säuren sind zweifellos als mehr oder wenig unphysiologisch anzusehen. Bekanntlich besteht im tierischen Organismus in allen Geweben und Körperflüssigkeiten eine sehr konstante H-Ionenkonzentration und alle Stoffwechselvorgänge, die zu einer Verschiebung derselben führen, werden durch ein sehr empfindliches und vielseitiges regulatorisches System ausgeglichen. Es sei hier nur erinnert an die verschiedenen Puffersysteme des Blutes und der Körperflüssigkeiten, die Alkalireserve und die Veränderungen in der Kohlensäurespannung usw., die bestrebt sind die geringsten Verschiebungen im Säure-Basen-Gleichgewicht des tierischen Körpers auszugleichen. Eine sehr grosse Bedeutung bei diesen regulatorischen Funktionen kommt vor allen auch den Nieren zu.

Jeder Überschuss an Säure oder Base, der im Organismus im Verlauf von Stoffwechselvorgängen entsteht oder mit der Nahrung zugeführt wird, muss letzten Endes durch die Nieren wieder ausgeschieden werden. Vor dieser Eliminierung des Säure- bzw. Basenüberschusses mit dem Harn müssen diese Verbindungen im Allgemeinen aber erst neutralisiert werden.

Ein starkes Überwiegen von Alkalien dürfte daher im Organismus durch Mobilisierung organischer Säuren, die ja im Verlaufe des Stoffwechsels leicht entstehen, ausgeglichen werden. Hierauf basierte ÖSTBERG (1931), wie bereits erwähnt, seine Befunde über die CS-Ausscheidung, indem er die Ansicht vertrat, dass die Zunahme der Citratkonzentration des Harns als regulatorische Funktion der Nieren zur Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts anzusehen sei. Wenn auch die CS-Ausscheidung nicht nur diese Aufgabe zu erfüllen hat, wie viele Forscher hervorgehoben haben und es auch aus den hier berichteten Untersuchungen hervorgeht, dürften die Östberg'schen Befunde heute doch allgemeine Anerkennung erlangt haben.

Andererseits scheint es aber auch sicher, dass der Organismus eine ganze Reihe andere Säuren zur Ausgleichung eines vorhandenen Alkaliüberschusses verwendet. Die hier berichteten Versuche dürften deutlich gezeigt haben, dass u. a. auch die KGS eine derartige Funktion zu erfüllen hat, wenn auch in viel geringerer Masse als die CS.

Von anderer Säuren, die dieselbe Aufgabe haben, sei hier auch die Kohlensäure erwähnt. Die Ausscheidung von grossen Carbonatmengen nach Belastung mit Alkalisalzen ist schon lange bekannt, u. a. richtete schon KARZAG (1917) bei seinen Rattenversuchen die Aufmerksamkeit hierauf. In meinen Belastungsversuchen konnte ich ausser der Kohlensäure und den quantitativ ermittelten Säuren in vielen Fällen eine starke Oxalsäureausscheidung beobachten. Diese war bisweilen so stark, dass sich nach kurzem Stehen des Harns zahlreiche Oxalsäurekristalle bildeten.<sup>1</sup> Ferner schienen die Belastungsharne auch oft aussergewöhnlich grosse Quantitäten Phosphat zu enthalten.

Die Milchsäure und Brenztraubensäure scheinen dagegen nicht in höherem Masse zur Ausgleichung des Basenüberschusses in Frage zu kommen. Bei den meisten Belastungsversuchen wurde keine stärkere Zunahme der Ausscheidung dieser Säuren gefunden. Auch sprechen in gewissen Grade die Untersuchungen einiger Forscher (u. a. RESNITSCHENKO und KOSMIN, 1929) über die Beziehungen der MS-Ausscheidung nach Muskelarbeit zur Harnacidität dafür, dass die Ausscheidung dieser Säure mit zunehmender Acidität wächst, woraus umgekehrt folgen würde, dass sie im alkalischen Harn vermindert ist.

<sup>1</sup> Quantitative Oxalsäurebestimmungen wurden bisher nicht vorgenommen, jedoch konnte die Oxalsäure auf Grund der typischen Kristalle und qualitativer Eigenschaften identifiziert werden.

Auch ein starkes Überwiegen von Säuren bzw. H-Ionen, welches unter physiologischen Bedingungen viel häufiger der Fall sein dürfte, wird vom tierischen Organismus ausgeglichen. Für die Neutralisierung des Säureüberschusses kommt einerseits die Alkalireserve in Frage, andererseits auch die Bildung von Ammoniak durch Desaminierung von Eiweisstoffen und Purinkörpern. Diese  $\text{NH}_3$ -Bildung dürfte bekanntlich vor allen in den Nieren stattfinden.

Auf Grund dieser theoretischen Erwägungen war es interessant auch die Wirkung der Belastung mit freien, unneutralisierten Säuren auf die Harnzusammensetzung, und vor allem auf die KGS- und CS-Ausscheidung zu untersuchen.

Belastungen mit freien Säuren dürften bisher nur in geringem Umfange ausgeführt worden sein. BLATHERWICK und LONG (1922) verabreichten 2 Versuchspersonen grosse Mengen Apfelsinensaft und untersuchten die Gesamtausscheidung organischer Säuren nach dem titrimetrischen Verfahren von VAN SLYKE und PALMER (1920). Aus der Zunahme der organischen Säuren im Harn schlossen diese Forscher, dass ca. 6 % der verabreichten CS der Verbrennung entgangen sei. Da aber keine direkte CS-Bestimmung vorgenommen wurde, dürften diese Versuche, wie ÖSTBERG hervorhebt, kaum beweisend sein. LEVI (1928) hat auch den Einfluss der Zufuhr grösserer Mengen Citronensaft auf den Harn von Versuchstieren untersucht und eine Zunahme der Phosphat- und Chloridausscheidung beobachtet. Die Ausscheidung organischer Säuren wurde dagegen nicht untersucht.

ÖSTBERG (1931) führte bei Menschen genaue Untersuchungen der CS-Ausscheidung nach Verabreichung saurer Salze und freier Säuren aus. Bei Belastung mit freier CS, bis zu 40 g, beobachtete dieser Forscher bei den Versuchspersonen in Bezug auf die CS-Ausscheidung individuelle Variationen; im Allgemeinen kam es jedoch zu einer verminderten CS-Ausscheidung, wenn das Säure-Basen-Gleichgewicht durch die verabreichte Säure beeinflusst wurde, welches durch ein Sinken des Harn-pH:s und eine Zunahme der Ammoniakausscheidung zum Ausdruck kam. War dagegen keine Störung dieses Gleichgewicht zu beobachten, konnte es in einigen Fällen zu einer leichten Zunahme der CS-Ausscheidung kommen, aber auch dann wurde nur ein sehr geringer Teil der verabreichten Menge im Harn wiedergefunden. — Nach Zufuhr von Calciumchlorid (bis zu 30 g), Ammoniumchlorid (8 g) und Salzsäure (bis zu 7 g) an mehreren aufeinander folgenden Tagen nahm die CS-Ausscheidung mit dem Harn bis auf nicht mehr nachweisbare Spuren der Säure ab. Ähnliche subnormale CS-Werte fand dieser Forscher fernerhin bei pathologischen Zuständen, bei denen eine starke Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts vorlag, wie z. B. diabetische Acidose, Urämie, schwere Nierenkrankheiten etc.

Ausser diesen Untersuchungen über die CS-Ausscheidung nach Verabreichung freier Säuren habe ich im Schrifttum keine Angaben gefunden.

Belastungsversuche mit freien Säuren wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit nur in beschränkter Masse ausgeführt. Es sei gleich anfangs bemerkt, dass die meisten Säuren in freiem Zustand, in Dosen entsprechend den verabreichten Salzmengen meist nicht von den Versuchstieren vertragen wurden und auf diese stark giftig wirkten. Ob es sich hierbei um eine direkt lokale ätzende Wirkung auf die Magendarmschleimhaut handelte, oder ob die Verabreichung so grosser Mengen von H-Ionen zu einer nicht zu kompensierenden Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts im Organismus führte, mag dahingestellt bleiben. Jedoch scheint es unwahrscheinlich, dass ein grosser Teil der organischen Säuren, die viel schwächer dissoziiert sind als die Salzsäure und weniger sauer reagieren als die Magenflüssigkeit, binnen einiger Stunden zum Tode führende Schleimhautläsionen hervorrufen. Ausserdem dürften bei allen Belastungen mit Säuren starke Nierenschädigungen vorgelegen haben, denn in den Fällen, wo überhaupt Harn erhalten wurde, enthielt derselbe immer Eiweiss. In anderen Fällen wiederum wurde gar kein Harn erhalten, oder wenigstens war die Diurese trotz Verabreichung grosser Flüssigkeitsmengen deutlich herabgesetzt.

Derartige Belastungsversuche wurden daher ausser mit CS nur mit einigen der physiologisch am wichtigsten Dicarbonsäuren, nämlich der Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure und Fumarsäure ausgeführt. Ferner wurde auch die Glutaminsäure als Salzsäureverbindung verabreicht.

Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle Nr. 35 zusammengefasst. Die Giftigkeit der verschiedenen Säuren war sehr verschieden. Die l-Äpfelsäure wurde in Mengen von 3.5 g pro kg relativ gut vertragen, ebenso die CS, 2.5 g pro kg. Dagegen wirkte die Bernsteinsäure in Mengen von 2.5 g pro kg stark giftig, indem von insgesamt sieben Tieren vier starben. Auch 2.0 g Fumarsäure pro 1 kg wirkten stark giftig. Dagegen wurde die grössere Dosis Glutaminsäure-HCl von den Tieren gut vertragen. Da die Harnausscheidung der Versuchstiere nach Belastung mit freien Säuren immer sehr gering war, konnte aus praktischen Gründen mit Ausnahme des Versuchs mit Äpfelsäure, die MS- und BTS-Ausscheidung nicht untersucht werden. Auch die AK konnten nur in einem Falle, nach Belastung mit Glutaminsäure, bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Belastungsversuche waren ungefähr die theoretisch erwarteten. Bei keinem der Versuche wurde eine positive Hydrazonprobe erhalten. Ebenso waren auch alle KGS-Werte, die ermittelt werden konnten, ganz niedrig, wenn auch



Tabelle Nr. 35.  
Belastungsversuche bei Ratten mit freien, nicht neutralisierten Säuren.

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis 1 kg. Gewicht gelöst in 50 cm <sup>3</sup> in g	Anzahl der Ratten	Harnmenge in 24 St. pro Ratte in cm <sup>3</sup>	Harn-pH	Ausfällungszelt der Hydrazonfällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg				Bemerkungen
						KGS	CS	MS	BTS	
l-Äpfelsäure .....	3.5	4	5.0	—	>60"	0.39	7.3	3.0	7.1	alb.+
" .....	3.5	4	8.5	—	>60"	—	6.4	—	—	alb.+
Bernsteinsäure <sup>1</sup> .....	2.5	5	5.5	5.2	>60"	—	1.4	—	—	alb.+; 3 Tiere gestorb.
" .....	2.5	2	8.0	6.5	15" >60"	0.45	2.1	—	—	alb.+; 1 Tier gestorb.
Chlronensäure .....	2.5	4	5.5	6.2	>60"	—	16.6	—	—	alb.+; 1 Tier gestorb.
Fumarsäure <sup>2</sup> .....	2.0	3	1.0	—	>60"	—	0.21	—	—	{ Aceton=49.0 γ
Glutamins.-HCl .....	3.6	5	13.6	—	>60"	1.83	0.43	—	—	{ OBS=0.26 mg

<sup>1</sup> entnommen aus Tabelle Nr. 34.  
<sup>2</sup> 2.0 g. Fumarsäure verabreicht in 75 cm<sup>3</sup> Lösung, wegen der Schwerlöslichkeit der Säure.

wohl kaum niedriger als im Normalharn. Nur nach Verabreichung der Glutaminsäure-HCL war ein leicht erhöhter Wert vorhanden, jedoch dürfte diese schwache Säure, wie die grosse Diurese und das Fehlen von Albumin im Harn zeigt, nicht so giftig gewirkt bzw. keine stärkere Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichts hervorgerufen haben.

Die CS-Ausscheidung war am kleinsten nach Belastung mit Säuren, die am giftigsten wirkten. Jedoch wurden in keinem Fall subnormale Werte erhalten. Bei Belastung mit freier Äpfelsäure war die CS-Ausscheidung deutlich erhöht (ca. 7 mg pro Tier, 10—15-fache Steigerung), aber auch nach Verabreichung der giftig wirkenden Bernsteinsäure war die Ausscheidung etwas grösser als normal. Bei der CS-Belastung wurden beinahe 17 mg CS mit dem Harn ausgeschieden, welches etwa 3.5 % der verabreichten Menge entspricht. Nach Verabreichung von Fumarsäure und Glutaminsäure entsprachen die CS-Werte ungefähr der Normalausscheidung.

Nach Belastung mit Äpfelsäure wurde ein verhältnismässig hoher BTS-Wert gefunden; die Ausscheidung pro Ratte betrug etwa 7 mg. Auf Grund dieser einzigen Bestimmung kann man jedoch nichts Sicheres hierüber sagen.

Um ferner den Einfluss des Neutralisationsgrades der verabreichten Säuren auf die Harnzusammensetzung näher zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen mit verschieden stark neutralisierten Säuren vorgenommen. Zu beiden Versuchen wurde die Bernsteinsäure in Mengen von 2.5 g pro kg gewählt, da ja diese Menge bei Verabreichung als Natriumsalz eine starke KGS- und CS-Ausscheidung hervorruft.

Die Säure wurde in beiden Versuchsserien völlig unneutralisiert (ohne NaOH-Zusatz) verabreicht, ferner halbneutralisiert, mit der halben theoretischen Alkalimenge (0.85 g NaOH pro 2.5 g Bernsteinsäure), ganz neutralisiert (1.70 g NaOH pro 2.5 g Bernsteinsäure) und schliesslich etwas überneutralisiert (1.87 bzw. 1.9 g NaOH pro 2.5 g Bernsteinsäure). Das pH der verabreichten 5 % Lösungen war entsprechend etwa 2.5, 5.0, 7.0 und 8.5 bzw. im zweiten Versuch 9.0. —

Die Ergebnisse der Harnuntersuchungen sind aus der Tabelle Nr. 36 zu entnehmen. Bei Verabreichung der freien Säure war die Hydrazonprobe negativ. Leider konnte die KGS wegen der kleinen Diurese nicht bestimmt werden. Die CS-Ausscheidung war aber klein. Die halbneutralisierte Säure rief in beiden Versuchen schon eine starke Zunahme der KGS- und CS-Ausscheidung hervor. Am

Tabelle Nr. 36.

Belastungsversuche mit 2.5 g Bernsteinsäure pro 1 kg Körpergewicht der Ratten bei verschieden starker Neutralisierung der Säure mit Natriumhydroxyd.<sup>1</sup>

Verabreichte Lösung		pH	NaOH-Zusatz in g	Anzahl der Tiere	Harnmenge pro Ratte in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Harn-pH	Ausfällungszeit der Hydrazonfällung in Sek.	Ausscheidung pro Ratte in 24 St. in mg		Bemerkungen
Neutralisationsgrad	KGS							CS		
Unneutralisiert	.....	2.5	0	5(2)	5.5	5.2	>60"	—	1.4	{ alb. +; 2 Tiere starben nach 10 Min. u. 1 nach ca. 8 St.
½-neutralisiert	.....	5.0	0.85	4	6.75	7.1	5"—10"	12.0	12.1	
¼-neutralisiert	.....	7.0	1.70	4	17.75	8.3	10">60"	18.7	17.8	
Überneutralisiert	.....	8.5	1.87	3	16.7	8.5	15">60"	13.2	17.9	
Unneutralisiert	.....	2.5	0	2(1)	8.0	6.5	15">60"	—	2.1	{ alb. +; 1 Tier starb nach etwa 8 St.
½-neutralisiert	.....	5.0	0.85	2	5.0	—	—	4.2	14.6	
¼-neutralisiert	.....	7.0	1.70	2	19.0	—	—	18.0	37.1	
Überneutralisiert	.....	9.0	1.90	2	15.0	—	—	7.2	23.8	

<sup>1</sup> Die 2.5 g Bernsteinsäure waren bei allen Versuchen in 50 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Das pH der verabreichten Lösung wurde mittels Indikatorpapierern bestimmt.

grössten war diese jedoch nach Verabreichung der völlig neutralisierten Säure. Dagegen waren die Werte nach Verabreichung der überneutralisierten Säurelösungen viel weniger erhöht. Hier war also wieder dasselbe paradoxe Verhalten, wie nach Verabreichung grosser Alkalimengen zu beobachten. Es scheint als ob in diesen Versuchen der geringe Überschuss an Natriumhydroxyd bereits leicht toxisch gewirkt und zu einer gewissen Hemmung der CS- und KGS-Bildung geführt hat.

Aus diesen Experimenten geht eindeutig hervor, dass die Verabreichung freier oder nur teilweise neutralisierter Säuren nicht dieselbe Wirkung auf die KGS- und CS-Ausscheidung hat wie die der entsprechenden Neutralsalze. Wenn auch bei den Rattenversuchen nach einmaliger Belastung mit diesen verhältnismässig schwach dissoziierten Säuren immer noch nachweisbare KGS- und CS-Mengen im Harn vorhanden waren, ist es doch offenbar, dass sich nicht nur die CS- sondern auch die KGS-Ausscheidung im Sinne der ÖSTBERG'schen Säure-Basen-Gleichgewichtstheorie verhielt.

## IV. Komplementierende experimentelle Untersuchungen bei Meerschweinchen und Kaninchen.

### 1. Meerschweinchenversuche (vgl. Tabelle Nr. 37).

Anschliessend an die Rattenversuche soll nun noch kurz über einige Belastungsversuche mit anderen Tieren berichtet werden. Im Folgenden werden zuerst die mit Meerschweinchen angestellten Untersuchungen erläutert.

Ebenso wie bei den Rattenversuchen wurden auch hier alle Belastungen oral ausgeführt. Im übrigen war die Technik der Verabreichung der Lösungen und der Harnsammlung dieselbe wie früher.

Die Versuchstiere befanden sich auf der gewöhnlichen Standardkost des Laboratoriums, welche folgende Zusammensetzung hatte:

Schwarzer Hafer . . . . .	45 %
Weizenkleie . . . . .	45 %
Kasein . . . . .	4.5 %
CaCO <sub>3</sub> . . . . .	4.5 %
NaCl . . . . .	1.0 %

Ausserdem erhielten die Tiere täglich Heu, Kohl, Kohlrüben und anderes Grünfutter.

Zu den Belastungsversuchen wurden meist ausgewachsene Tiere zwischen 400—800 g verwendet; durchschnittlich betrug das Gewicht der Tiere etwa 650 g. Zu allen Belastungsversuchen wurden immer neue, früher nicht verwendete Tiere benutzt.

Die Säuren wurden wie bei den Rattenversuchen als neutrale Natriumsalze in Natrium äquivalenten Mengen verabreicht. Belastungen wurden vorgenommen mit Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Citronensäure, Milchsäure und Gluconsäure. Im Sammelharn von 24 St. wurde ausser den qualitativen Proben auf AK und BTS und der Hydrazonprobe, die KGS-, CS-, MS- und BTS-Ausscheidung quantitativ bestimmt.

Zum Vergleich wurde zweimal der Harn von Normaltieren und einmal der Harn nach Verabreichung physiologischer Kochsalzlösung untersucht.

Die Belastungsversuche wurden mit steigenden Mengen der verschiedenen Salze bis zu toxischen Gaben vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle Nr. 37 zusammengestellt.

Die Meerschweinchen erwiesen sich als weniger widerstandsfähig bei der Belastung mit den Natriumsalzen, indem Gaben, die von den Ratten symptomlos vertragen wurden, oft bereits letal wirkten. So wirkten die Natriumsalze der Gluconsäure und Brenztraubensäure schon in Dosen entsprechend 900 mg Natrium pro kg stark giftig, während die Bernsteinsäure und Citronensäure noch in Dosen entsprechend 1000 mg Natrium vertragen wurde. Die tödliche Grenze dieser Säuren lag bei Salzmengen mit 1200 mg Natriumgehalt pro kg. Am besten wurde noch die Milchsäure vertragen, die in Mengen entsprechend 1200 mg Natrium nicht zum Tode der Tiere führte.

Im Allgemeinen hatte bei den Meerschweinchenversuchen die Belastung mit den genannten Verbindungen einen weniger starken Einfluss auf die KGS- und CS-Ausscheidung als bei den Rattenversuchen, jedoch war die Wirkung auf die Harnzusammensetzung grundsätzlich dieselbe. Die teilweise schwächere Reaktion der Meerschweinchen dürfte, wenigstens bis zu gewissem Grade, dadurch zu erklären sein, dass die Tiere viel empfindlicher sind als die Ratten und oft zu grosse Gaben erhielten. Bei der Verabreichung von toxischen Dosen tritt nämlich genau wie bei den Ratten eine Hemmung der Wirkung ein, sodass die ausgeschiedene KGS- und CS-Menge oft kleiner ist als bei der Belastung mit weniger grossen Dosen.

Die grösste KGS- und CS-Ausscheidung wurde bei den Meerschweinchen nach Verabreichung von brenztraubensaurem Natrium in 750 mg Natrium entsprechenden Mengen beobachtet. Die Belastung mit grösseren Mengen Bernsteinsäure und CS hatte einen viel kleineren Effekt. Die CS-Belastung schien überhaupt keinen sicheren Einfluss auf die KGS-Ausscheidung zu haben, dagegen wurden von der verabreichten Säure bei Belastung mit 1000 und 1200 mg Natrium entsprechenden Mengen 4—9 % im Harn wiedergefunden. Die MS hatte ebenso wie bei den Rattenversuchen keinen deutlichen Einfluss auf die CS- und KGS-Ausscheidung. Auch die Wirkung der Fumarsäure war sehr gering, allerdings wurde diese nur in kleiner Dosis versucht (300 mg Natrium).

Auch die MS- und BTS-Ausscheidung war bei allen Belastungen etwas erhöht. Die höchsten MS-Werte wurden nach Verabreichung von Pyruvat gefunden, wohingegen bei diesen Versuchen keine Zunahme der BTS-Ausscheidung zu konstatieren war.

Die AK-Ausscheidung wurde nicht quantitativ verfolgt, jedoch

Belastungsversuche mit Meerschweinchen.<sup>1</sup>

Verabreichte Säure	Verabreichte Dosis pro 1 kg Gewicht gewogen als		Verabreichte Natriummenge pro 1 kg Gewicht in mg	Verabreichtes Flüssigkeitsvolumen pro 1 kg Gewicht in cm <sup>3</sup>	Anzahl der Meerschweinchen
	Säure	Na-Salz			
Nihil .....				0	4
„ .....				0	4
0.85 % NaCl-Lösung ....				12	2
Brenztraubensäure .....		2.452	600	10	2
„ .....		3.065	750	10	2
„ .....		3.065	750	10	4
„ .....		3.678	900	15	2
„ .....		4.904	1200	15	2
Bernsteinsäure .....	2.565		1000	20	2
„ .....	3.078		1200	20	2
„ .....	3.843		1500	20	2
Citronensäure .....		3.740	1000	20	2
„ .....		4.114	1200	20	2
„ .....		5.610	1500	20	2
Fumarsäure .....	0.757		300	20	2
Milchsäure .....		2.505	600	20	2
„ .....		3.758	900	20	2
„ .....		5.010	1200	20	2
Gluconsäure .....		2.636	300	20	2
„ .....		5.272	600	20	2
„ .....		7.908	900	20	2

<sup>1</sup> Zu den Belastungsversuchen wurden ausgewachsene Meerschweinchen von 430—800 g Körpergewicht verwendet. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 650 g. Alle Belastungen wurden, wie bei den Rattenversuchen, per os ausgeführt. Die Bernstein- und Fumarsäure wurden mit starker NaOH zu pH 7.0 neutralisiert, die übrigen Verbindungen wurden als Natriumsalze gewogen.

Verabreichung von Natrium-Salzen verschiedener Säuren.

Harnmenge pro Tier in 24 St. in cms	Spez. Gewicht des Harns	Ausfällungszeit der Hydraxon-fällung in Sek.	Ausscheidung pro Meerschweinchen in 24 St. in mg				Bemerkungen <sup>2</sup>
			KGS	CS	MS	BTS	
20.0	1.035	>60"	1.7	1.5	6.2	2.5	} Kontrolltiere
13.75	1.045	15"—60"	1.1	3.1	—	—	
35.0	1.021	>60"	2.4	2.1	9.7	0.8	
42.0	1.032	8"—45"	12.3	2.9	14.7	3.2	} Harn-pH=7.8
25.0	—	—	36.1	74.5	—	—	
32.5	1.038	15"—60"	14.7	54.7	26.1	0.8	
Alle Tiere gestorben. Dosis letalis. Kein Harn.							
, , , , , , ,							
55.0	1.037	40"—60"	13.8	28.9	14.9	5.1	} Beide Tiere gestorben. Dosis letalis.
15.0	1.044	25"—60"	7.6	58.5			
22.5	1.050	10"—20"	25.7	72.5			
62.5	1.029	>60"	3.3	56.2	10.6	8.6	} Das eine Tier gestorben. Kein Harn.
21.0	1.046	5"—45"	2.7	106.1			
Alle Tiere gestorben. Dosis letalis. Kein Harn.							
70.0	1.044	5">60"	4.4	10.6	—	—	} Alle Tiere hatten starke Diarrhoe, sodass der Harn mit Kot vermischt war.
42.5	1.033	>60"	1.8	14.0	—	—	
90.0	1.023	5">60"	3.7	10.1	—	—	
32.5	1.035	10">60"	6.9	6.1	—	—	
9.0	—	15"—45"	—	9.1	—	—	
11.52	—	10"—30"	—	7.2	—	—	
30.0	—	alle Tiere gestorben nach 24 St.					

<sup>2</sup> In allen Harnproben waren die qualitativen Proben auf AK (Lange und Gerhardt) negativ. Auch die Farbreaktion von SIMON-PIAUX war niemals positiv.



waren die Proben von LANGE und GERHARDT in allen Belastungs-urinen negativ.

## 2. Kaninchenversuche (vgl. Tabelle Nr. 38).

Schliesslich wurden auch einige Belastungsversuche mit Natriumpyruvat bei Kaninchen vorgenommen. Derartige Versuche hatte seinerzeits, wie bereits erwähnt, vor allem MAYER (1912) ausgeführt und nach Verabreichung grösserer Dosen Glucosurie bei den Versuchstieren konstatiert. Bei seinen Experimenten hatte dieser Forscher verschiedene Applikationsarten des brenztraubensauren Natriums probiert und gefunden, dass die Kaninchen die subcutane Verabreichung am besten vertrugen.

Bei oraler Belastung gingen die Tiere nach Verabreichung von 10—15 g Natriumpyruvat sämtlich an akuten Entzündungserscheinungen des Magendarmkanals zugrunde. Bei intravenöser Einspritzung von 500 mg des Natriumsalzes starben die Tiere schon nach Injektion der ersten Tropfen unter Krämpfen. Bei subcutaner Verabfolgung vertrugen Tiere von 2—2.5 kg 7—8 g Brenztraubensäure, gegeben als Natriumsalz, während 9—10 g meist zum Tode der Tiere führte.

Bei den hier berichteten Versuchen wurde Kaninchen von annähernd 3 kg Gewicht das Pyruvat in steigenden Dosen per os gegeben. Versuchstier Nr. 2 erhielt pro 1 kg Gewicht genau die 300 mg Natrium enthaltende Salzmenge (Gewicht 2.75 kg, also 3.977 g Na-pyruvat oder 825 mg Natrium). Kaninchen Nr. 3 erhielt unabhängig von seinem Gewicht genau die doppelte Menge, Kaninchen Nr. 4 die dreifache und Kaninchen Nr. 5 die vierfache Menge. Da die Tiere ungefähr 3 kg wogen, entsprechen die verabreichten Mengen also ungefähr 600, 900 und 1200 mg Natrium pro kg Gewicht.

Als Kontrolle wurde ein weiteres Tier (Kaninchen Nr. 1) verwendet, das nicht belastet wurde. Endlich wurde auch eine Belastung mit einer 300 mg Natrium entsprechenden Menge pro kg vorgenommen, wobei dem Kaninchen (Versuchstier Nr. 6) die Lösung intravenös eingespritzt wurde. Hierbei wurde das Pyruvat (3.759 g bzw. 780 mg Natrium) in 11 cm<sup>3</sup> steriles destilliertes Wasser gelöst und sehr langsam in die Ohrvenen eingespritzt (etwa 1 cm<sup>3</sup> pro Minute). Da das Tier nach Einspritzung von ca. 6 cm<sup>3</sup> einen Dyspnoeanfall und Krämpfe bekam, wurde der Rest erst nach Verlauf von 8 St. gegeben. Die zweite Einspritzung vertrug das Tier symptomlos. Auch von diesem Tier wurde der Sammelharn von 24 St. seit Beginn der Belastung untersucht.

Tabelle Nr. 38.

Belastungsversuche bei Kaninchen mit brenztraubensaurem Natrium.

Kaninchen Nr.	Gewicht der Tiere in g	Verabreichte Dosis			Harnmenge in 24 St. in cm <sup>3</sup>	Spez. Gewicht des Harns	Ausfällungszeit der Hydrazonfällung im Sek.	Ausscheidung in 24 St. in mg				Bemerkungen	
		Na-pyruvat in g	Natrium in mg	Natr. pro 1 kg Gewicht in mg				KGS	Bernstein-säure	CS	MS		BTS
1	3000			Kontrolltier, nicht belastet	450	1.010	>60"	6.7	20.8	9.0	219.2	0	
2 <sup>1</sup>	2750	3.977	825	300	110	1.031	>60"	13.5	11.0	9.6	327.9	0	alb. —; Lange —
3 <sup>1</sup>	3300	7.954	1650	600	300	1.025	10"—60"	211.6	11.4	55.5	421.9	0	alb. —; Lange —; Gerhardt —
4 <sup>1</sup>	3270	11.931	2475	900	310	1.034	15"—60"	70.4	4.2	37.7	252.8	18.8	alb. —; Simon-Piaux +; Gerh. —
5 <sup>1</sup>	3180	15.908	3300	~1200	130	1.050	15"—60"	11.0	22.4	63.0	94.3	15.7	{ alb. —; + } Starb nach 25 St.
6 <sup>2</sup>	2600	3.759	780	300	110	1.045	15"—60"	1.8	0.8	24.8	377.4	66.6	{ alb. —; Simon-Piaux +; Gerh. — } Starb nach 3 Tagen.

<sup>1</sup> Belastung per os mit 28.9 % Na-pyruvat-Lösung. Kaninchen Nr. 2 erhielt 13.75 cm<sup>3</sup>, Nr. 3 die Doppelte, Nr. 4 die Dreifache und Nr. 5 die Vierfache Dosis.

<sup>2</sup> Kaninchen Nr. 6 wurde das brenztraubensaure Natrium intravenös verabreicht: Zu Beginn erhielt das Tier 2.05 g in 6.0 cm<sup>3</sup> und nach 8 St. den Rest in 5.0 cm<sup>3</sup>. Die Einspritzungen wurden sehr langsam vorgenommen, trotzdem bekam das Tier das erste Mal Krämpfe und einen Dyspnoe-Anfall. Die zweite Einspritzung rief keine derartigen Symptome hervor. — Das Tier starb am 3. Tage nach der Belastung an Pneumonie. —

Ehe auf die Harnuntersuchungen bei diesen Versuchen eingegangen wird, muss noch erwähnt werden, dass die Kaninchen das gebräuchliche Futter bestehend aus schwarzem Hafer (mit Schalen), Heu und Grünfütter, vor allem Kohl, Kohlrüben etc. erhalten hatten.

Die Harnsammlung geschah in Metallkäfigen, deren unterer Boden in einen Trichter auslief, während das Kaninchen auf einen Zwischenboden aus engmaschigem Drahtnetz sass. — Während der Harnsammlung erhielten die Tiere Kohl- oder Rübenfutter wie vor dem Versuch.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle Nr. 38 zu finden. Wie man sieht wurde in diesen Versuchen die Dosis von etwa 12 g Pyruvat entsprechend 900 mg Natrium pro kg gut von dem Versuchstier vertragen. Die Dosis von etwa 16 g (1200 mg Natrium pro kg) führte dagegen 25 St. nach der Belastung zum Tode. — Bei der intravenösen Verabreichung von 3.76 g Pyruvat (d. h. 300 mg Natrium pro kg) starb das Versuchstier 3 Tage nach der Belastung an Lungenentzündung. Die grössere Toleranz der Kaninchen bei diesen Versuchen, besonders bei intravenöser Verabreichung, im Vergleich zu den Untersuchungen von MAYER, dürfte dadurch zu erklären sein, dass die von diesem Forscher verwendeten BTS-Präparate mit anderen Säuren verunreinigt waren. Es besteht ferner die Möglichkeit, dass bei der intravenösen Belastung etwas überneutralisierte BTS-Lösungen verwendet wurden, die schon auf Grund ihrer alkalischen Reaktion stark toxisch wirken müssen.

Bei den Kaninchenversuchen wurde der Harn qualitativ auf Zucker, Aceton und Eiweiss untersucht; ferner wurde das spezifische Gewicht bestimmt und die Probe von SIMON-PIAUX auf BTS und die Hydrazonausfällungsprobe auf Carbonylverbindungen ausgeführt. Quantitativ wurde die KGS-, CS, MS-, BTS- und Bernsteinsäureausscheidung untersucht.

In keinem der Belastungsurine waren die Reduktionsproben auf Zucker positiv. Die von MAYER beobachtete Zuckerausscheidung nach Belastung mit BTS konnte also nicht bestätigt werden. Zu demselben negativen Resultat sind bekanntlich auch viele andere Forscher schon früher gekommen.

Auch die Proben auf AK (LANGE und GERHARDT) waren bei allen Versuchen negativ. Dagegen war die Reaktion von SIMON-PIAUX im Harn der Kaninchen Nr. 4, 5 und 6 leicht positiv. Eiweiss wurde nicht mit dem Harn ausgeschieden.

Der Belastungsharn reagierte in allen Fällen stark alkalisch und enthielt viel Carbonate. Das spezifische Gewicht des Harns war nach der Belastung ebenfalls erhöht, was ja ohne weiteres verständlich ist.

Die KGS-Ausscheidung nahm nach Belastung mit BTS stark zu. Die grösste Ausscheidung wurde nach Verabreichung einer mittleren Dosis (ungefähr 600 mg Natrium pro kg) gefunden, während höhere Dosen nur eine geringere Zunahme bewirkten. Die Kaninchen verhielten sich bei diesen Versuchen also ähnlich wie die Meerschweinchen bei Belastung mit Pyruvat. Die grössere, toxisch wirkende Pyruvatmenge scheint demnach eine Hemmung der KGS-Ausscheidung zu veranlassen. Die Bernsteinsäureausscheidung wurde auch bei den Kaninchen im Vergleich zu der Normalausscheidung nicht beeinflusst.

Sonderbar war bei den Kaninchenversuchen, dass die CS-Werte nicht so stark anstiegen wie die KGS-Werte.<sup>1</sup> Überhaupt war die CS-Ausscheidung, auch beim Kontrollkaninchen, erstaunlich klein im Verhältnis zur MS-, KGS- und Bernsteinsäureausscheidung.

Die MS-Ausscheidung scheint bei diesen Tieren schon unter normalen Bedingungen viel grösser zu sein als die Ausscheidung der anderen Säuren. Nach Belastung mit BTS nahm sie jedoch noch deutlich zu. Dagegen war die BTS-Ausscheidung sehr gering selbst nach Belastung mit grösseren Pyruvatmengen. Im normalen Kaninchenharn konnte oft gar keine BTS nachgewiesen werden.<sup>2</sup> Nur bei der intravenösen Verabreichung des Pyruvats wurde eine grössere Menge BTS mit dem Harn ausgeschieden, jedoch auch dann nur etwas über 2 % der verabreichten Menge.

Die in diesem Kapitel kurz erläuterten Meerschweinchen- und Kaninchenversuche sind nur in relativ geringer Zahl vorgenommen worden. Auch wurde nur die Wirkung der Belastung mit Natriumpyruvat und den Natriumsalzen einiger anderer Säuren auf die Harnzusammensetzung untersucht. Man muss sich daher vor weitgehenden Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen hüten. Es scheint jedoch berechtigt zu sagen, dass die Wirkung der Belastungsversuche auf die Harnzusammensetzung dieser Tiere grundsätzlich sehr ähnlich ist wie bei den Ratten. Bei allen drei Tierarten kommt es nach oraler Verabreichung der Natriumsalze physiologisch wichtiger Säuren zur starken Zunahme der KGS- und CS-Ausscheidung, während die MS-, BTS-, Bernsteinsäure- und Acetonausscheidung nur weniger oder garnicht beeinflusst zu werden scheint.

<sup>1</sup> Die Kaninchenversuche entsprechen in Bezug auf die KGS- und CS-Ausscheidung mehr den Menschenversuchen von SIMOLA und KRUSIUS (1939); auch beim Menschen nahm die KGS-Ausscheidung nach Belastung mit BTS stark zu (etwa 40-fach) während die CS-Ausscheidung nur mässig erhöht war (2—3-fach).

<sup>2</sup> Es wurden zahlreiche derartige Bestimmungen ausgeführt, die Werte brauchen hier aber nicht angeführt zu werden.

## V. Besprechung der Ergebnisse.

Es erhebt sich nun die Frage, wie die beschriebenen Versuchsergebnisse zu deuten sind. Beim Überblicken der erzielten Resultate sind die Veränderungen in der Ausscheidung der CS und KGS am augenscheinlichsten. Dagegen ist es eine bemerkenswerte Tatsache, ganz im Gegensatz zu den Vorstellungen, die anfangs teilweise Anlass zu dieser Untersuchung gaben, dass keine Beeinflussung der BTS- bzw. MS-Ausscheidung konstatiert werden konnte. Weder die verschiedenen Kostgemische und die Verabreichung von Alkalien, noch die Belastungsversuche mit verschiedenen, dem BTS-Umsatz nahestehenden Verbindungen verursachten irgendeinen deutlicheren Einfluss auf die BTS- bzw. MS-Menge im Harn. Selbst bei Belastungsversuchen mit BTS oder MS war nur selten eine gewisse Zunahme der Ausscheidung dieser Säuren im Harn zu beobachten.

Diese Resultate, so erstaunlich sie anfangs scheinen, stimmen aber zuguterletzt überein mit früher in diesem Laboratorium erhobenen Befunden. Wie erwähnt, wies SIMOLA im Harn B-avitaminotischer Ratten grosse Mengen KGS, aber keine deutliche BTS-Ausscheidung nach, ganz im Gegensatz zu den früheren Annahmen. Und auch nach Belastung mit BTS fand er starke KGS-Ausscheidung ohne deutliche Zunahme der BTS-Ausscheidung. Man muss wohl aus diesem, so zu sagen negativen Verhalten der BTS bei all diesen Versuchen folgern, dass die im intermediären Stoffwechsel gebildete BTS, ebenso wie die MS, zum weitaus überwiegenden Teil umgesetzt wird und dass mit dem Harn meist nur ein geringer Prozentsatz ausgeschieden wird. Jedenfalls verhält sich die BTS- und MS-Ausscheidung in vieler Beziehung konträr zu derjenigen der CS und KGS, denn meine Untersuchungen zeigen, dass all die Faktoren, welche eine starke Einwirkung auf die CS- bzw. KGS-Bildung haben, ohne deutlichen Einfluss auf die BTS- und MS-Ausscheidung sind.

Auch in Bezug auf die AK waren meine Versuche ziemlich negativ. Dass bei absolutem Hungerzustande eine vermehrte AK-Ausscheidung vorkommen kann, war schon früher bekannt. Die verschiedenen Kostformen und die Belastungen mit den meisten versuchten Säuren hatten keinen sichereren Einfluss auf die AK-Ausscheidung. Eine Ausnahme bilden ausser der Acetondicarbonsäure und dem Aceton, deren Wirkung auf die AK-Ausscheidung ohne weiteres verständlich erscheint, nur die Essigsäure und die Maleinsäure. Die Bildung von vor allem Acetessigsäure aus Essigsäure ist schon eine lang bekannte Tatsache; dagegen ist die Wirkung der Maleinsäure in dieser Beziehung schwerer zu erklären. Jedoch möchte man am ehesten an eine Giftwirkung denken. Besonders die Malonsäure soll nach KREBS und JOHNSON im Tierversuch derart die AK-Bildung beeinflussen.

Was die CS und KGS anbetrifft, wurde gezeigt, dass die Verfütterung alkalischer Kost, wie auch die Belastung mit nicht toxisch wirkenden Dosen von Alkalien bei den Versuchstieren nicht nur eine starke CS-Ausscheidung, sondern auch eine beachtenswerte Bildung von KGS hervorruft. Weiterhin wurde aber auch bei zahlreichen Belastungsversuchen mit den neutralen Natriumsalzen teils strukturell sehr verschiedener Säuren eine zusätzliche, bedeutend grössere CS- und KGS-Ausscheidung erzielt, als wie die entsprechende Alkalimenge sie bewirkte. Es muss sich also in diesen Fällen um eine spezifische Wirkung der verabreichten Substanz handeln. Diese Auffassung ist auch schon deswegen richtig, weil eine grosse Zahl anderer Säuren, die zum überwiegenden Teil als wichtige intermediäre Stoffwechselprodukte bekannt sind, keinen die Alkaliwirkung übersteigenden Einfluss auf die CS- und KGS-Ausscheidung hatten.

Besonders augenfällig war bei den Belastungsversuchen, dass meist ein bestimmtes konstantes Verhältnis zwischen der CS- und KGS-Ausscheidung bestand. In der überwiegenden Zahl der Versuche konnte sogar eine gewisse Parallellität in der Grösse der Ausscheidung festgestellt werden, indem die KGS-Werte durchschnittlich ca. ein Drittel der CS-Werte ausmachten. Diese nahe Übereinstimmung im Verhalten dieser beiden Säuren findet durch die erwähnten Untersuchungen von MARTIUS und KNOOP über die engen Beziehungen der CS und KGS im Zwischenstoffwechsel eine natürliche Erklärung.

Die Deutung der starken CS- und KGS-Bildung bei den Versuchstieren nach Verabreichung der Natriumsalze vieler, strukturell recht verschiedener Säuren ist nicht einfach. Meines Erachtens

sind hierbei mehrere verschiedene Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen: 1) Die Alkaliwirkung, 2) eine direkte Bildung, 3) eine Stockungswirkung, 4) Vergiftung, 5) verschiedene unbekanntere Ursachen.

Was die erste Möglichkeit anbetrifft, muss man sich in Anschluss an die Erklärung von ÖSTBERG über die Regulierung des Säure-Basen-Gleichgewichts durch CS-Ausscheidung vorstellen, dass der Organismus einen Überschuss an Alkalien durch Bildung bzw. Mobilisierung organischer Säuren auszugleichen sucht. Für die CS-Ausscheidung wies ÖSTBERG diesen Mechanismus mit ziemlicher Sicherheit nach. Auf Grund der hier dargelegten Untersuchungen dürfte es aber klar geworden sein, dass die KGS sich genau so verhält. Auf die gleiche Art verwendet der Tierkörper auch noch andere Säuren wie z. B. die Kohlensäure und eventuell auch die Oxalsäure zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH:s.

Da die meisten der zu den Belastungsversuchen verwendeten Säuren im tierischen Stoffwechsel leicht umgesetzt bzw. verbrannt werden dürften, liesse sich denken, dass es nach der Verabreichung der Neutralsalze bald zu einem Überschuss an Base kommt, der von dem Organismus durch CS- und KGS-Bildung neutralisiert würde. Diese Erklärung ist wohl bis zu einem gewissen Grade richtig, sie gibt uns aber keinen Aufschluss darüber, warum einige Säuren einen überaus starken Einfluss auf die CS- und KGS-Bildung haben, während andere nur einen der Alkaliwirkung entsprechenden Effekt haben und ein Teil sogar ganz unwirksam ist.

Neben dieser Erklärung durch Aufrechterhalten des Säure-Basen-Gleichgewichts kommt auch die Möglichkeit in Frage, dass eine geringe Verschiebung der Reaktion nach der alkalischen Seite im Gewebe, direkt die Bildung von CS und KGS befördert. Tatsächlich hat HALLMAN in leicht alkalischem Milieu eine stärkere CS-Synthese aus Dicarbonsäuren bei in-vitro-Versuchen erzielt. Hiermit stimmt aber nicht der in dieser Arbeit erhaltene Befund überein, dass etwas überneutralisierte Säuren bei Belastungsversuchen einen geringeren Effekt haben als die entsprechenden genau neutralen Verbindungen.

Aus diesen Erwägungen geht hervor, dass die Alkaliwirkung allein die erhaltenen Resultate nicht erklären kann.

Was die zweite Möglichkeit der direkten Bildung der CS und KGS anbetrifft, scheint diese sehr wahrscheinlich zu sein für alle Verbindungen, die im Stoffwechsel als direkte Vorläufer der beiden Säuren in Frage kommen. Behalten wir besonders das MARTIUS-

KNOOP'sche Umsatzschema im Auge, nach welchem, wie erwähnt, aus BTS und Oxalessigsäure CS entsteht, die dann wieder über KGS zu Oxalessigsäure bzw. BTS abgebaut wird, so lässt es sich leicht verstehen, dass alle Säuren, die als Zwischenglieder an dieser Reaktionsfolge teilnehmen, einen starken Effekt auf die CS- und KGS-Bildung haben. So fände die Wirkung der BTS, der C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren, vor allem der Bernsteinsäure und Äpfelsäure, der Aconitsäure und auch der OBS eine zwanglose Erklärung.

Die geringe Wirkung der Fumarsäure in meinen Versuchen, während ihr optischer Antipode, die Maleinsäure, die meist als unphysiologische Verbindung angesehen wird, einen starken Effekt hatte, steht in scheinbarem Widerspruch zu dieser Erklärung. Jedoch dürfte es sich hier, bei oraler Belastung der Versuchstiere, um eine Resorptionsstörung handeln, da die schwer lösliche Fumarsäure wahrscheinlich von der Magensalzsäure ausgefällt wird. Hiermit stimmt auch überein, dass andere Forscher, wie ORTEN und SMITH und KREBS und JOHNSON bei intravenöser Applikation der Säure eine starke Wirkung erzielten. — Auch die schwache Wirkung der Oxalessigsäure, die bei in-vitro-Versuchen mit die stärkste CS-Bildung hervorruft, dürfte ähnlich zu erklären sein. Höchst wahrscheinlich ist es, dass die Enol-Oxalessigsäure, die in wässriger Lösung sehr unbeständig ist, schon bei der Neutralisation mit Natriumhydroxyd teilweise zersetzt wurde.

Dagegen lässt sich nicht durch die direkte Bildung die starke Wirkung einer Reihe von anderen Verbindungen erklären, wie z. B. von Acetondicarbonsäure, Brenztraubensäurealdol, Maleinsäure, Malonsäure usw. Auch scheint andererseits vor allem das negative Resultat nach der Belastung mit MS, die doch leicht in BTS übergehen soll, gegen diese Erklärung zu sprechen.

Bei der direkten Bildung von KGS muss ausser an den Weg über CS auch an die Umaminierung einer  $\alpha$ -Ketosäure mit Glutaminsäure nach BRAUNSTEIN und KRITZMANN gedacht werden. Die Bildung von KGS hinge demgemäss davon ab, in welchem Umfang aus der verabreichten Verbindung eine Ketosäure entsteht, die zur Umaminierung mit Glutaminsäure in Frage käme.

Derart liesse sich der Effekt der BTS-Belastung auf die KGS-Bildung durch Umaminierung erklären. Tatsächlich fanden SIMOLA und KRUSIUS (1939) bei Belastung von Menschen mit BTS eine KGS-Ausscheidung, die die CS-Ausscheidung bei weitem übertraf. Bei den hier beschriebenen Rattenversuchen war dagegen der Einfluss der BTS-Belastung auf die KGS-Bildung im Vergleich zu derjenigen der CS relativ gering; auch hatte die Belastung von



Ratten mit Glutaminsäure keine deutliche Wirkung auf die KGS- und CS-Ausscheidung. In Zukunft sollen Kombinationsversuche mit BTS und Glutaminsäure bei in-vivo-Belastungen vorgenommen werden, um weiteren Aufschluss über die Frage der Bildung der KGS durch Umaminierung zu gewinnen.

Auch die überaus starke Wirkung des Brenztraubensäurealdols auf die KGS-Ausscheidung kann möglicherweise durch Umaminierung erklärt werden. Die Tatsache nämlich, dass nach den Beobachtungen von SIMOLA in-vitro nach Zusatz von Aldol Dicarbonsäuren, vor allem KGS, entstehen, scheint darauf hinzudeuten, dass eine derartige Umaminierung tatsächlich stattfindet. Hierdurch wird aber noch nicht erklärt, warum der Effekt des Aldols auf die KGS-Bildung viel stärker ist als der der BTS.

Schliesslich liesse sich auch an eine direkte CS-Bildung im Anschluss an Umaminierungsvorgänge denken. Bei Verabreichung von BTS bzw. BTS-Aldol könnte eine Umaminierung mit Asparaginsäure geschehen, wobei Oxalessigsäure entstände, die wiederum leicht zu CS umgesetzt würde. Zur weiteren Klärung dieser Frage müssen in Zukunft ebenfalls Kombinationsversuche mit BTS und Asparaginsäure ausgeführt werden.

Der starke Einfluss der KGS-Belastung auf die CS-Ausscheidung lässt sich dagegen kaum durch direkte Bildung erklären. Es dürfte höchst unwahrscheinlich sein, dass die Oxydation der CS über  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -Carboxyglutarsäure zu KGS ein rückläufiger Vorgang ist. Die Wirkung der KGS lässt sich jedoch leicht durch Stockung des normalen CS-Abbaus erklären. Man muss annehmen, dass eine Überschwemmung des Organismus mit KGS zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes führt und den Verlauf der Reaktion  $CS \rightarrow KGS$  hemmt, wodurch die CS-Ausscheidung erklärt würde.

Eine gleichartige Stockungswirkung könnte natürlich auch durch andere Zwischenglieder des normalen CS-Abbaus erfolgen, z. B. durch Aconitsäure,  $C_4$ -Dicarbonsäuren und BTS. Wie wir sehen, handelt es sich um dieselben Verbindungen, die auch bei der direkten Bildung der CS und KGS in Frage kommen. Auf Grund meiner Untersuchungen dürfte es aber unmöglich sein zu entscheiden, welche dieser Erklärungen die stichhaltige ist.

Als vierte Erklärungsmöglichkeit ist noch die Giftwirkung in Erwägung zu ziehen. Für einige Verbindungen, wie schon im Kapitel über die Belastungsversuche erwähnt, dürfte dies sicher die richtige Erklärung sein. An erster Stelle ist hier die Malonsäure zu nennen. Die meisten Forscher sind sich heute einig darüber,

dass diese Säure durch ihre grosse Affinität zu einigen wichtigen Dehydrasen, vor allem der Succinodehydrogenase, aber auch derjenigen der CS und KGS als Enzymgift wirkt und den enzymatischen Abbau verhindert. Hierdurch wird die starke Wirkung dieser Säure bei Belastungsversuchen gut erklärt. Zu demselben Schlussatz sind in letzter Zeit vor allem auch KREBS und JOHNSON gekommen. Diese Forscher fanden ebenfalls, dass die Malonsäure in erster Linie eine sehr starke Bernsteinsäureausscheidung hervorruft durch Hemmung der Wirkung der Succinodehydrogenase. In den hier referierten Versuchen wurde die Bernsteinsäure-Bildung nach Belastung mit Malonsäure nicht geprüft.

Durch Vergiftung der Enzymsysteme lässt sich wahrscheinlich auch noch die Wirkung einiger anderer Säuren erklären. In Bezug auf die Maleinsäure sind die Forschungsergebnisse noch nicht eindeutig; teils wird sie als Enzymgift angesehen, teils wird hervorgehoben, dass sie im Organismus genau wie die anderen C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren dehydriert wird. Schliesslich ist es auch möglich, dass die Citraconsäure (Methylmalonsäure), die ja nach neueren Untersuchungen im Tierkörper kaum umgesetzt wird, als Enzymgift wirkt.

Durch eine der angeführten Erklärungsmöglichkeiten lässt sich die Wirkung sehr vieler Säuren bei den Belastungsversuchen auf die CS- und KGS-Bildung einigermassen erklären. Der Effekt einiger Verbindungen bleibt aber doch mehr oder weniger unverständlich und man muss daher auch noch andere unbekanntere Möglichkeiten annehmen. So ist z. B. die viel stärkere Wirkung des Brenztraubensäurealdols als der freien BTS nur schwer allein durch Umaminierungsvorgänge zu erklären. Auch der etwas grössere Effekt der iso-Buttersäure auf die CS- und KGS-Ausscheidung im Vergleich zu dem der normalen Buttersäure ist schwer verständlich.

Es muss aber in diesem Zusammenhang nochmals hervorgehoben werden, dass die Reihenfolge nach der Wirkungsgrösse der einzelnen Verbindungen auf die CS- und KGS-Ausscheidung keine absolute ist und nur mit gewissen Vorbehalten Gültigkeit hat. Es spielen bei derartigen in-vivo-Versuchen so viele Faktoren ein, die Einfluss auf das Resultat haben können, dass bei der Beurteilung der Ergebnisse eine gewisse Kritik am Platze ist. Kleine Unterschiede in der Wirkungsgrösse verschiedener Verbindungen dürfen daher nicht zu sehr beachtet werden. U. a. hängt das Ergebnis eines oralen Belastungsversuchs von der Resorption der verabreichten Substanz ab. Diese wiederum steht in naher Beziehung zu

der Löslichkeit der Verbindung, der chemischen Beständigkeit beispielsweise der Magensäure gegenüber und der Leere des Magens. Bei schneller Resorption dürfte es ferner leichter zu einer Stockungswirkung kommen, die durch die plötzliche Anhäufung der Verbindung in allen Geweben bedingt ist. Bei verzögerter Resorption wiederum könnte die verabreichte Säure leichter allmählich oxydiert bzw. zu anderen Stoffwechselprodukten umgesetzt werden. Schliesslich scheint bei den Tieren auch eine individuelle, verschiedene Reaktionsstärke vorzuliegen, die vielleicht von dem Alter, dem Ernährungszustand u. a. Umständen abhängt. Ferner sind auch noch Fehlermöglichkeiten bei den chemischen Bestimmungen zu berücksichtigen.

Auf Grund meiner Untersuchungen kann nicht entschieden werden, welche der beschriebenen Hypothesen über die CS- und KGS-Bildung bei in-vivo-Belastungsversuchen der Wirklichkeit entspricht. Hier wurden daher nur kurz die Gründe erörtert, die für die eine oder andere Möglichkeit sprechen. Zu weiterer Klarheit gelangt man vielleicht durch kombinierte Belastungsversuche mit verschiedenen Säuren. Grössere Erfolgsmöglichkeiten dürften aber vor allem in Zukunft in-vitro-Versuche mit verschiedenen Geweben bieten, bei denen nach Bebrütung mit einer oder mehreren Verbindungen in verschiedenen mengenmässigen Verhältnissen die Bildung all dieser intermediären Stoffwechselprodukte verfolgt wird. Durch zahlreiche derartige Untersuchungen wird man in der Erforschung dieser Umsatzvorgänge weiter kommen und den genaueren Chemismus der ihnen zu Grunde liegenden verwickelten Stoffwechselprozesse näher aufklären können.

## VI. Zusammenfassung.

1. Es wird eine kurze Übersicht über den Zwischenstoffwechsel der Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Citronensäure gegeben, wobei besonders die nahen Beziehungen der Brenztraubensäure zur Milchsäure und den Acetonkörpern beachtet werden wie auch der Zusammenhang all dieser Verbindungen mit dem Umsatz der Kohlenhydrate.

2. Nach kurzer kritischer Durchsicht der gebräuchlichen quantitativen Methoden zur Bestimmung der Brenztraubensäure, die grösstenteils auf Reaktionen der Carbonylgruppe basieren und daher nicht spezifisch für diese Säure sind, wird eine Modifikation der schon früher angegebenen Reduktionsmethode zur Bestimmung der Brenztraubensäure in kleinen Harnquantitäten beschrieben, wie auch ein neues Verfahren zur spezifischen Bestimmung der  $\alpha$ -Ketoglutarensäure. Auch über die Bestimmung der Milchsäure, Citronensäure und der Acetonkörper werden einige praktische Beobachtungen angeführt.

3. Die Verfütterung verschiedener Kostgemische (gemischte Kost, Zucker-, Eiweiss- oder Fett-reiche Kost konstanter Zusammensetzung) während längerer Zeit, sowohl wie die Belastung mit grossen Mengen Traubenzucker verursachte bei Ratten keine grösseren Veränderungen in der Ausscheidung der  $\alpha$ -Ketosäuren, der Milch- und Citronensäure oder der Acetonkörper.

4. Bei absolutem Hunger schieden die Ratten während der ersten Fastentage vermehrte Mengen Aceton mit dem Harn aus. Trotz dieser Acidose zeigte bisweilen auch die Citronensäureausscheidung eine zunehmende Tendenz, dagegen war die Ausscheidung der  $\alpha$ -Ketosäuren und der Milchsäure bei den Hungertieren nicht verändert.

5. Die Belastung mit teils toxisch wirkenden Mengen Aceton hatte keinen Einfluss auf die Ausscheidung der erwähnten Säuren; von der verabreichten Acetonmenge wurden 15—20 % im Harn wiedergefunden.

6. Die perorale Belastung mit Natriumbicarbonatlösungen in kleinen und mittleren Gaben rief bei Ratten eine Zunahme der Citronen- und  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung hervor, deren Grösse jedoch mit steigender Dosis nicht immer entsprechend zunahm. Grosse Bicarbonatmengen mit offensichtlich toxischer Wirkung verursachten sogar eine deutliche Hemmung der Ausscheidung dieser Säuren.

7. Bei Zusatz von 7.5 resp. 6.5 % Bicarbonat zu den verschiedenen Kostgemischen (gemischte Kost, Zucker-, Eiweiss- oder Fett-reiche Kost) war bei den Ratten, ausser einer vermehrten Citronensäureausscheidung, auch eine beträchtliche Zunahme der  $\alpha$ -Ketoglutarsäurewerte im Harn zu beobachten. Diese »Alkaliwirkung« war am stärksten bei Zusatz von Bicarbonat zu der Fettreichen Kost; hierbei erreichte die  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung dieselbe Grösse wie die der Citronensäure, während sie bei den anderen Alkalidiäten nur ca. ein Drittel derselben betrug. — Auf die Ausscheidung der Brenztraubensäure, Milchsäure und der Acetonkörper hatte die alkalische Kost keinen deutlichen Einfluss.

8. Bei Belastung der auf Alkalikost gehaltenen Ratten mit Glucose war eine starke Abnahme der Citronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung sowie eine Verschiebung des Harn-pH nach der sauren Seite zu verzeichnen.

9. Bei Belastung von Ratten mit den Natriumsalzen einer grossen Zahl, als Zwischenstufen im intermediären Stoffwechsel in Frage kommender, organischer Säuren in verschiedenen Gewichtsverhältnissen wurde eine die Alkaliwirkung weit übertreffende Citronensäure- und  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung konstatiert, wobei meist ein ziemlich konstantes Verhältnis in der Grösse der Citronensäure- und  $\alpha$ -Ketoglutarsäurewerte bestand.

a. Eine derartige Wirkung bei den Rattenversuchen hatten die Natriumsalze folgender Säuren: Brenztraubensäurealdol, Maleinsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, l-Äpfelsäure, Bernsteinsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Citronensäure, Essigsäure, Acetondicarbonsäure, Aconitsäure, Brenztraubensäure, Isobuttersäure, Malonsäure und Fumarsäure. — Ferner rief die Glutarsäure sonderbarerweise eine starke Citronensäureausscheidung hervor, während die  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung nicht beeinflusst wurde.

b. Nur eine geringe oder wenigstens nicht die Alkaliwirkung übertreffende Citronensäure- und  $\alpha$ -Ketoglutarsäureausscheidung bewirkten die Natriumsalze folgender Säuren: l- und d,l-Asparaginsäure, Milchsäure, Normobuttersäure, Oxalessigsäure(?), Glutaminsäure,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, Glycolsäure, Crotonsäure, Glucosäure, Tartronsäure, Mesoxalsäure und Adipinsäure.

10. Auf die Ausscheidung der Brenztraubensäure und Milchsäure hatte die Belastung mit den Natriumsalzen der erwähnten Säuren keinen deutlichen Einfluss, wenn auch die Harnwerte im Allgemeinen, vielleicht bedingt durch die starke Diurese, etwas erhöht waren.

11. Die Acetonausscheidung wurde ausser nach Belastung mit Aceton und mit Acetondicarbonsäure nur durch die Maleinsäure und die Essigsäure deutlich erhöht.

12. Die meisten als Natriumsalze verabreichten physiologischen Säuren schienen von den Ratten zum überwiegenden Teil verbrannt zu werden. Bei Belastung mit Milchsäure, Brenztraubensäure, Citronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutarensäure wurde nur ein geringer Teil der verabreichten Menge wieder mit dem Harn ausgeschieden, meist nicht mehr als einige Prozent, höchsten etwa 6—8 Prozent. Jedoch die Adipinsäure wurde zu etwa 55 % und die Glutarsäure zu etwa 44 % unverändert im Harn wiedergefunden.

13. Die Belastung mit freien, nicht neutralisierten Säuren rief keine Zunahme der KGS- und CS-Ausscheidung hervor und führte meist, falls die Tiere die Belastung überstanden, zu Nierenschädigungen. Ebenso war die Wirkung nur teilweise neutralisierter Säuren geringer als die der entsprechenden Neutralsalze.

14. Bei oraler Belastung von Meerschweinchen mit den Natriumsalzen der Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Fumarsäure, Milchsäure und Gluconsäure sowie von Kaninchen mit Natriumpyruvat wurden grundsätzlich dieselben Veränderungen in der Harnzusammensetzung beobachtet wie bei den Ratten, wenn auch Unterschiede in der Reaktionsstärke der Tiere vorlagen. Im Allgemeinen vertrugen die Meerschweinchen und Kaninchen die Belastung mit grösseren Dosen schlechter als die Ratten.

15. Als Erklärungsmöglichkeiten der grossen Citronensäure- und  $\alpha$ -Ketoglutaräureausscheidung bei den Belastungsversuchen werden die Alkaliwirkung, die direkte Bildung aus den verabreichten Säuren, eine Stockung im Abbau der Citronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutaräure, eine Vergiftung der dehydrierenden Enzyme der Citronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutaräure und andere unbekannte Ursachen in Erwägung gezogen.

---

## VII. Literaturverzeichnis.

- ABRAMSON, H. A., EGGLETON, M. G. und EGGLETON, P.: J. biol. Chem. 1927. 75: 763.
- ALLEN, C. F. H.: J. Amer. Chem. Soc. 1930. 52: 2950.
- ALVAREZ, E. P.: Chem. News 1905. 91: 209, ref. nach Chem. Zbl. 1905. I: 1743.
- ALVAREZ, E. P.: Bull. Soc. Chim. France 1905. III. 33: 716, ref. nach Chem. Zbl. 1905 II: 357.
- ALVAREZ, E. P.: Gaz. chim. ital. 1905. II. 35: 435, ref. nach Chem. Zbl. 1905. II: 1694.
- ALVAREZ, E. P.: Behrens Chem. 1905. I. 26: 1155.
- AMBERG, S. und Mc CLURE, W. B.: Amer. J. Physiol. 1917. 44: 453.
- AMBERG, S. und MAVER, M. E.: J. biol. Chem. 1921, 46: 15.
- ANDERSEN, E.: Z. physiol. Chem. 1926. 159: 300.
- ANDERSON, J. A., PETERSON, W. H. und FRED, E. B.: Soil. Science 1928. 25: 123, ref. nach Chem. Zbl. 1928. I: 2623.
- ANNAU, E.: Z. physiol. Chem. 1934. 224: 141.
- ANNAU, E.: Ebenda 1935. 236: 58.
- ANNAU, E.: Ebenda 1935. 244: 145.
- ANNAU, E. und ERDÖS, T.: Ebenda 1939. 257: 111.
- ARAKI, T.: Ebenda 1894. 19: 422.
- AUHAGEN, E.: Naturw. 1931. 19: 916.
- AUHAGEN, E.: Z. physiol. Chem. 1932. 204: 149.
- AUHAGEN, E.: Ebenda 1932. 209: 20.
- BAER, J. und BLUM, L.: Arch. exper. Path. (D). 1907. 56: 92.
- BAER, J. und BLUM, L.: Beitr. chem. Physiol. u. Path. 1907. 10: 80.
- BAER, J. und BLUM, L.: Arch. exper. Path. (D.) 1908. 11: 101.
- BAER, J. und BLUM, L.: Beitr. chem. Physiol. u. Path. 1911. 65: 1.
- BANGA, I., OCHOA, S. und PETERS, R. A.: Biochem. J. 1939. 33: 1109.
- BARRENSCHEEN, H. K. und DREGUS, M.: Biochem. Z. 1931. 233: 305.
- BARRON, E. S. G.: J. biol. Chem. 1936. 113: 695.
- BARRON, E. S. G. und LYMAN, C. M.: Ebenda 1939. 127: 143.
- BEILSTEIN, F. und WIEGAND, E.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1884. I. 213: 840.
- BERNHARD, K. und ANDREAE, M.: Z. physiol. Chem. 1936. 245: 103.
- BERNHAUER, K.: Die oxydativen Gärungen, Berlin 1932.

- BERTHELOT, A. und AMOUREUX, B.: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) 1924. 6: 338.
- BLAISE, E. E. und GAULT, H.: Bull. Soc. Chim. 1911. 4. 9: 455.
- BLATHERWICK, N. R. und LONG, M. L.: J. biol. Chem. 1922. 53: 103.
- BLEYER, B. und BRAUN, W.: Biochem. Z. 1927. 183: 310.
- BLUM, L. und WÖRINGER, P.: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) 1920. 2: 88.
- BOOTHBY, W. M. und ADAMS, M.: Amer. J. Physiol. 1934. 107: 471.
- BRAUNSTEIN, A. E. und KRITZMANN, M. G.: Nature (Brit.) 1937. 140: 503.
- BRAUNSTEIN, A. E. und KRITZMANN, M. G.: Enzymologia (Nd.) 1937. 2: 129.
- BÜLOW, C. und SEIDEL, F.: Ann. Chem. 1924. 439: 48.
- CASE, E. M. und COOK, R. P.: Biochem. J. 1931. 25: 1319.
- CASE, E. M.: Ebenda 1932. 26: 753.
- CLAUSEN, S. W.: J. biol. Chem. 1922. 52: 263.
- CLIFT, E. P. und COOK, R. P.: Biochem. J. 1932. 26: 1788.
- COOK, R. P.: Ebenda 1930. 24: 1526.
- DAKIN, H. D. und JANNEY, N. W.: J. biol. Chem. 1913. 15: 1777.
- DAVIS, J. G.: Biochem. Z. 1933. 265: 90.
- DEBUS, H.: Ann. Chem. 1863. 127: 332.
- DENIGÈS, G.: Z. anal. Chem. 1899. 38: 718.
- DENIGÈS, G.: Ebenda 1901. 40: 121.
- DISCHE, Z. und LASZLO, D.: Biochem. Z. 1927. 187: 344.
- DISCHE, Z. und ROBBINS, S. S.: Ebenda 1934. 271: 304.
- EGRIFE, E.: Z. anal. Chem. 1933. 95: 323.
- ELLIOT, K. A. C. und BAKER, Z.: Biochem. J. 1935. 29: 2433.
- ELLIOT, K. A. C., BENOY, M. P. und BAKER, Z.: Ebenda 1935. 29: 1937.
- ELLIOT, K. A. C. und GREIG, M. E.: Ebenda 1937. 31: 1021.
- ELLIOT, K. A. C., GREIG, M. E. und BENOY, M. P.: Ebenda 1937. 31: 1003.
- ELLIOT, K. A. C. und SCHROEDER, E. F.: Ebenda 1934. 28: 1920.
- EMBDEN, G.: Z. physiol. Chem. 1925. 143: 297.
- EMBDEN, G. und OPPENHEIMER, M.: Biochem. Z. 1912. 45: 186.
- EMBDEN, G. und OPPENHEIMER, M.: Ebenda 1913. 55: 335.
- EMMICH, R.: Z. physiol. Chem. 1939. 261: 61.
- EULER, H. v., ADLER, E., GÜNTHER, G. und DAS, N. B.: Ebenda 1938. 254: 61.
- EULER, H. v., ADLER, E., GÜNTHER, G. und PLASS, M.: Biochem. J. 1939. 33: 1028.
- FASOLD, H.: Z. Biol. 1930. 90: 192.
- FASOLD, H.: Z. Kinderhk. 1930. 49: 709.
- FASOLD, H.: Klin. Wschr. 1931. 10: 961.
- FERNBACH, A. und SCHOEN, M.: C. r. Acad. scien. 1914. 158: 1719, ref. nach Chem. Zbl. 1914. II: 423.
- FLASCHENTRÄGER, B.: Z. physiol. Chem. 1926. 159: 297.
- FLASCHENTRÄGER, B. und BERNHARD, K.: Ebenda 1936. 238: 221.
- FLASCHENTRÄGER, B. und BERNHARD, K.: Ebenda 1938. 256: 71.
- FLOCK, E., BOLLMAN, J. L. und MANN, F. C.: J. biol. Chem. 1938. 125: 49.
- FRICKE, R.: Z. physiol. Chem. 1922. 119: 39.



- FRIEDEMANN, T. E., COTONIO, M. und SHAFFER, P. A.: J. biol. Chem. 1927. 73: 335.
- FRIEDEMANN, T. E. und KENDALL, A. I.: Ebenda 1929. 82: 23.
- FRIEDMANN, E.: Beitr. chem. Physiol. u. Path. 1908. 11: 202.
- FROMAGEOT, C. und DESNUELLE, P.: Biochem. Z. 1934. 279: 174.
- FUCHS, H. J.: Z. physiol. Chem. 1933. 221: 271.
- FUCHS, H. J. und BRÜGGEMANN, J.: Ebenda 1934. 225: 35.
- FÜRTH, O. v. und CHARNASS, D.: Biochem. Z. 1910. 26: 199.
- FÜRTH, O., MINNIBECK, H. und EDEL, E.: Ebenda 1934. 269: 379.
- GARZAROLLI-THURNLACKH, K. v.: Mh. Chem. 1899. 20: 467, ref. nach Chem. Zbl. 1899. II: 750.
- GONCE, J. E. und TEMPLETON, H. L.: Amer. J. Dis. Childr. 1930. 39: 265.
- GORR, G.: Biochem. Z. 1932. 254: 8.
- GORR, G.: Ebenda 1932. 254: 12.
- GORR, G. und WAGNER, J.: Ebenda 1932. 254: 5.
- GREEN, D. E., NEEDHAM, D. M. und DEVAN, J. G.: Biochem. J. 1937. 31: 2327.
- GREIG, M. E., MUNRO, M. P. und ELLIOT, K. A. C.: Ebenda 1939. 33: 443.
- HAHN, A. und NIEMER, H.: Z. Biol. 1934. 95: 169.
- HAHN, A., NIEMER, H. und FISCHBACH, I.: Ebenda 1938. 97: 582.
- HALLMAN, N.: Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B 1938. 11: 23.
- HALLMAN, N.: Ebenda B 1939. 12: 11.
- HALLMAN, N. und SIMOLA, P. E.: Ebenda B 1938. 11: 21.
- HALLMAN, N. und SIMOLA, P. E.: Science 1939. 90: 2347.
- HENSEL, M.: Z. physiol. Chem. 1915. 93: 405.
- HINSBERG, K. und AMMON, R.: Biochem. Z. 1936. 284: 343.
- HIRSCH-KAUFFMANN, H.: Z. physiol. Chem. 1924. 140: 25.
- HOLLEMANN, A. T.: Rec. trav. chim. Pays-Bas 1904. 23: 169., ref. nach Chem. Zbl. 1904. II: 194.
- HUSZÁCK, S.: Z. physiol. Chem. 1935. 236: 66.
- JOHNSON, R. E.: Biochem. J. 1936. 30: 31.
- JOHNSON, R. E. und EDWARDS, H. T.: J. biol. Chem. 1937. 118: 427.
- JONG, K. A. W. DE: Rec. trav. chim. Pays-Bas 1901. 20: 90., ref. nach Chem. Zbl. 1901. I: 1277. und BEILSTEIN: Handbuch organ. Chem. 1921. III: 609.
- JONG, S. DE und PICCARD, J.: Arch. néerld. Physiol. 1937. 22: 117., ref. nach Chem. Zbl. 1937. II: 3049.
- KAPELLER-ADLER, R. und LAUDA, E.: Biochem. Z. 1932. 258: 429.
- KARZAG, L.: Ebenda 1917. 84: 225.
- KENDALL, A. I. und FRIEDEMANN, T. E.: J. infect. Dis. (Am.) 1930. 47: 176.
- KNOOP, F.: Oxydationen im Tierkörper, Stuttgart 1931.
- KNOOP, F. und JOST, H.: Z. physiol. Chem. 1923. 130: 338.
- KNOOP, F. und MARTIUS, C.: Ebenda 1936. 242: I.
- KNOOP, F. und MARTIUS, C.: Ebenda 1938. 254: I.
- KOSTYTSCHEW, S. und SOLDATENKOW, S.: Ebenda 1927. 168: 124.
- KOSTYTSCHEW, S. und SOLDATENKOW, S.: Ebenda 1928. 176: 287.

- KREBS, H. A.: *Klin. Wschr.* 1932. 11: 1744.  
 KREBS, H. A.: *Z. physiol. Chem.* 1933. 218: 157.  
 KREBS, H. A.: *Nature (Brit.)* 1936. 138: 288.  
 KREBS, H. A.: *Biochem. J.* 1937. 31: 661.  
 KREBS, H. A.: *Ebenda* 1938. 32: 108.  
 KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A.: *Ebenda* 1937. 31: 645.  
 KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A.: *Ebenda* 1937. 31: 772.  
 KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A.: *Enzymologia (Nd.)* 1937. 4: 148.  
 KREBS, H. A., SALVIN, E. und JOHNSON, W. A.: *Biochem. J.* 1938. 32: 113.  
 KRISHNA, B. H. R. und SREENIVASAYA, M.: *Ebenda* 1928. 22: 1169.  
 KRUSIUS, F.-E.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B* 1938. 11: 10.  
 KRUSIUS, F.-E. und SIMOLA, P. E.: *Nord. Naturforscher Kongress, Helsinki, Ber.* 1936.  
 KRUSIUS, F.-E. und SIMOLA, P. E.: *Biochem. Z.* 1937. 290: 428.  
 KRUSIUS, F.-E. und SIMOLA, P. E.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B.* 1938. 11: 24.  
 KRUSIUS, F.-E. und VESA, A.: *Acta Soc. Medic. fenn. Duodecim A* 1939. 21: 3.  
 KUYPER, A. C. und MATTILL, H. A.: *J. biol. Chem.* 1933. 103: 151.  
 LAKI, K.: *Z. physiol. Chem.* 1935. 236: 35.  
 LANGECKER, H.: *Arch. exper. Path. (D.)* 1933. 171: 744.  
 LANGECKER, H.: *Biochem. Z.* 1934. 273: 43.  
 LARSSON, A. und MYRBÄCK, K.: *Svensk Kemisk Tidskr.* 1939. 51: 51  
 LAUERSEN, F.: *Ebenda* 1935. 280: 38.  
 LAUERSEN, F.: *Klin. Wschr.* 1936. 339.  
 LAUERSEN, F. und WAHLLÄNDER, H.: *Biochem. Z.* 1938. 298: 273.  
 LAUFBERGER, W.: *Ebenda* 1927. 181: 220.  
 LEHNARTZ, E.: *Z. physiol. Chem.* 1928. 179: 1.  
 LEVENE, P. A. und MEYER, G. M.: *J. biol. Chem.* 1914. 17: 443.  
 LEVI, A.: *Boll. Soc. med.-chir. Modena* 1928. 29: 29., ref. nach ÖSTBERG 1931.  
 LIEB, H. und ZACHERL, M. K.: *Z. physiol. Chem.* 1932. 211: 211.  
 LIEBEN, F.: *Biochem. Z.* 1923. 135: 240.  
 LIPMANN, F.: *Skand. Arch. Physiol.* 1937. 76: 186.  
 LIPMANN, F.: *Ebenda* 1937. 76: 255.  
 LIPMANN, F.: *Nature (Brit.)* 1937. 140: 25.  
 LIPMANN, F.: *Enzymologia (Nd.)* 1937. 4: 65.  
 LOEB, A.: *Biochem. Z.* 1912. 47: 118.  
 LOHMANN, K. und SCHUSTER, P.: *Naturw.* 1937. 25: 26.  
 LOHMANN, K. und SCHUSTER, P.: *Biochem. Z.* 1937. 294: 188.  
 LONG, C.: *Biochem. J.* 1938. 32: 1711.  
 LONG, C. und PETERS, R. A.: *Ebenda* 1939. 33: 759.  
 LONGO, v.: *Z. physiol. Chem.* 1877/78. 1: 213.  
 LU, G. D.: *Biochem. J.* 1939. 33: 249.  
 LUPIN, v.: *Z. anal. Chem.* 1936. 106: 70.  
 LUSK, G.: *Erg. Physiol.* 1912. 12: 315.

- MAGNUSSON, H.: Acta paediatr. (Schwd.) 1932. 13: 345.
- MANN, F. C. und MAGATH, T. B.: Arch. int. Med. 1922. 30: 73., ref. nach Chem. Zbl. 1923. I: 268.
- MARGARIA, R. und PONZIO, E.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. 1937. 12: 573.
- MARTIUS, C.: Z. physiol. Chem. 1937. 247: 104.
- MARTIUS, C.: Ebenda 1938. 257: 29.
- MARTIUS, C. und KNOOP, F.: Ebenda 1937. 246: I.
- MAZÉ, P. und RUOT, M.: C. r. Soc. Biol. 1916. 79: 706.
- MAYER, P.: Biochem. Z. 1912. 40: 441.
- MAYER, P.: Ebenda 1913. 49: 486.
- Mc CLURE, W. D.: J. biol. Chem. 1922. 53: 357.
- Mc CLURE, W. D. und SAUER, L. W.: Amer. J. Physiol. 1922. 62: 140.
- Mc GOWAN, G. K. und PETERS, R. A.: Biochem. J. 1937. 31: 1637.
- MENDEL, B., BAUCH, M. und STRELITZ, F.: Klin. Wschr. 1931. 10: 118.
- MENDEL, B. und GOLDSCHIEDER, I.: Biochem. Z. 1925. 134: 163.
- MEYERHOF, O. und LOHMANN, K.: Ebenda 1934. 271: 89.
- MILLER, B. F. und MUNTZ, J. A.: J. biol. Chem. 1938. 126: 413.
- MORACZEWSKI, W. und LINDNER, E.: Biochem. Z. 1921. 125: 49.
- MOYLE: Biochem. J. 1924. 18: 351.
- MÜLLER, D.: Biochem. Z. 1935. 275: 347.
- MÜLLER-PARCHAN, W.: Z. physiol. Chem. 1933. 218: 209.
- MÄRTENSSON, J.: Skand. Arch. Physiol. 1938, 80:303.
- MÄRTENSSON, J.: Skand. Arch. Physiol. 1939, 83:113.
- NEUBERG, C. und ARINSTEIN, B.: Biochem. Z. 1921. 117: 269.
- NEUBERG, C. und KERB, J.: Ebenda 1912. 43: 494.
- NEUBERG, C. und KERB, J.: Ebenda 1912. 47: 405.
- NEUBERG, C. und KERB, J.: Ebenda 1912. 47: 415.
- NEUBERG, C. und KOBEL, M.: Ebenda 1928. 203: 463.
- NEUBERG, C. und KOBEL, M.: Ebenda 1929. 216: 495.
- NEUBERG, C. und RINGER, M.: Ebenda 1915. 71: 226.
- OCHOA, S. und PETERS, R. A.: Biochem. J. 1938. 32: 1501.
- OHTA, K.: Biochem. Z. 1912. 44: 481.
- ORTEN, J. M. und SMITH, A. H.: J. biol. Chem. 1937. 117: 555.
- ÖSTBERG, O.: Biochem. Z. 1929. 208: 352.
- ÖSTBERG, O.: Ebenda 1930. 226: 162.
- ÖSTBERG, O.: Skand. Arch. Physiol. 1931. 62: 81.
- ÖSTBERG, O.: Ebenda 1934. 67: 265.
- OTANI, Z.: Z. physiol. Chem. 1925. 143: 230.
- PETERS, R. A.: Biochem. J. 1936. 30: 2206.
- PETERS, R. A.: Chem. Weekblad 1937. 34: 422, ref. nach Chem. Zbl. 1937. II: 1393.
- PETERS, R. A.: Dtsch. med. Wschr. 1937. 63: 1144.
- PETERS, R. A.: Biochem. J. 1937. 31: 2240.
- PETERS, R. A. und THOMPSON, R. H. S.: Biochem. J. 1934. 28: 916.
- PI SUÑER, A. und FARRAN, M.: Biochem. Z. 1932. 256: 241.
- PI SUÑER, A. und FARRAN, M.: Ebenda 1936. 287: 113.

- PLATT, B. S. und LU, G. D.: *Quart. J. Med.* 1936. 5: 355., ref. nach JOHN-  
SON, R. E. und EDWARDS, H. T. 1937.
- POHL, J.: *Arch. exper. Path. (D.)* 1896. 37: 413.
- POSTERNACK: *C. r. Soc. Physic. Hist. Nat. Genève* 1927. 44: (I) 519., ref.  
nach HINSBERG, K. und LANG, K.: *Medizinische Chemie*, Berlin u.  
Wien 1938.
- PUCHER, G. W., SHERMAN, C. C. und VICKERY, H. B.: *J. biol. Chem.* 1936.  
113: 235.
- QUASTEL, J. H.: *Biochem. J.* 1924. 18: 365.
- QUASTEL, J. H. und WOOLRIDGE: *Ebenda* 1929. 22: 689.
- RESNITSCHENKO, M. S. und KOSMIN, N. P.: *Biochem. Z.* 1929. 215: 26.
- RINGER, A. J.: *J. biol. Chem.* 1914. 17: 281.
- ROSE, W. C.: *Chem. Zbl.* 1924. II: 2410.
- ROSE, W. C.: *Ebenda* 1925. II: 669.
- ROSENWALD, L.: *Biochem. Z.* 1926. 168: 324.
- SALANT, W. und WISE, L. E.: *J. biol. Chem.* 1916. 28: 27.
- SALKOWSKI, E.: *Z. physiol. Chem.* 1879. 3: 79.
- SATTA, G.: *Beitr. chem. Physiol. u. Path.* 1905. 6: 376.
- SCHUCK, C.: *J. Nutrition* 1934. 7: 679., ref. nach *Chem. Zbl.* 1934. II:  
1802.
- SHERMANN, C. C., MENDEL, L. B. und SMITH, A. H.: *J. biol. Chem.* 1936.  
113: 247.
- SHERMANN, C. C., MENDEL, L. B. und SMITH, A. H.: *Ebenda* 1936. 113: 265.
- SIMOLA, P. E.: *Biochem. Z.* 1932. 254: 229.
- SIMOLA, P. E.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B.* 1936. 11: 4.
- SIMOLA, P. E.: *Ebenda B* 1936. 11: 20.
- SIMOLA, P. E.: *Nord. Naturforscherkongress Helsinki, Ber.* 1936. 559.
- SIMOLA, P. E.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B* 1937. 10: 19.
- SIMOLA, P. E.: *Skand. Arch. Physiol.* 1938. 80: 375.
- SIMOLA, P. E.: *Acta med. scand.* 1938. Suppl. 90.
- SIMOLA, P. E.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B* 1939. 12: 10.
- SIMOLA, P. E.: *Biochem. Z.* 1939. 302: 84.
- SIMOLA, P. E. und ALAPEUSO, H.: *Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.)*  
*B* 1938. 11: 17.
- SIMOLA, P. E. und ALAPEUSO, H.: *Ebenda B* 1939. 12: 9.
- SIMOLA, P. E., HALLMAN, N. und ALAPEUSO, H.: *Ebenda B* 1939. 12: 10.
- SIMOLA, P. E. und KOSUNEN, T.: *Ebenda B* 1938. 11: 22.
- SIMOLA, P. E. und KRUSIUS, F.-E.: *Ebenda B* 1938. 11: 9.
- SIMOLA, P. E. und KRUSIUS, F.-E.: *Z. physiol. Chem.* 1939. 261: 209.
- SIMOLA, P. E., KRUSIUS, F.-E. und ALAPEUSO, H.: *Suomen Kemistilehti*  
*(Acta chem. fenn.) B* 1938. 11: 18.
- SIMOLA, P. E. und PUUTULA, K.: *Ebenda B* 1937. 10: 7.
- SIMOLA, P. E., STENBERG, M. und UUTELA, E.: *Ebenda B* 1937. 10: 34.
- SIMON, E. und NEUBERG, C.: *Biochem. Z.* 1931. 232: 479.
- SIMON, L.: *C. r. Acad.* 1897. 125: 534., ref. nach *Chem. Zbl.* 1897. II:  
1000.

- SIMON, L.: Bull. Soc. Chim. Paris 1898. 19: 294., ref. nach Chem. Zbl. 1898. I: 985.
- SIMON, L. und PIAUX, L.: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) 1924. 6: 477.
- SLYKE, D. D. VAN: J. biol. Chem. 1917. 32: 455.
- SLYKE, D. D. VAN und PALMER, W. W.: Ebenda 1920. 41: 567.
- STAHR, L.: Nord. farm. tidskr. 1895. 2: 141., ref. nach ÖSTBERG 1931.
- STAHR, L.: Z. anal. Chem. 1897. 36.
- STRAUB, F. B.: Z. physiol. Chem. 1936. 244: 117.
- STRAUB, F. B.: Ebenda 1937. 249: 189.
- STÖHR, R. und HENZE, M.: Ebenda 1932. 206: 1.
- SÜLLMANN, H. und SCHÄRER, E.: Schweiz. med. Wschr. 1932. 13: 619.
- SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Z. physiol. Chem. 1937. 249: 211.
- SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Studies on Biological Oxidation and some of its Catalyts, Budapest u. Leipzig 1937.
- SZENT-GYÖRGYI, A. v., und GÖSZY, B.: Z. physiol. Chem. 1935. 236: 54.
- THOMPSON, R. H. S. und JOHNSON, R. E.: Biochem. J. 1935. 29: 694.
- THUNBERG, S.: Skand. Arch. Physiol. 1920. 40: 1.
- THUNBERG, S.: Biochem. Z. 1929. 206: 109.
- THUNBERG, S.: Acta path. et microbiol. scand. 1933. Suppl. 16: 535. vgl. auch ABDERHALDEN: Handbuch biol. Arbeitsmethoden, Berlin u. Wien 1933. IV. 1: 2017.
- TOENNISSEN, E. und BRINKMANN, E.: Z. physiol. Chem. 1930. 187: 137.
- UNDERHILL: J. biol. Chem. 1912. 12: 115.
- URBACH, C.: Biochem. Z. 1931. 236: 164.
- VERKADE, P. E., VAN DER LEE, J. und VAN ALPHEN, A. J. S.: Z. physiol. Chem. 1935. 237: 186.
- WAGNER-JAUREGG, T. und RAUEN, H.: Ebenda 1935. 237: 227.
- WARBURG, O., KUBOWITZ, F. und CHRISTIAN, W.: Biochem. Z. 1930. 227: 245.
- WEISKE, H. und FLECHSIG: J. Landw. 1889. 199., ref. nach PI-SUÑER BAYO, C., und FOLCH PI, J.: Biochem. Z. 1931. 242: 306.
- WEIL-MALHERBE, H.: J. Soc. Chem. Ind., London 1936. 55: 838., ref. nach KREBS und JOHNSON (1937).
- WEIL-MALHERBE, H.: Biochem. J. 1936. 30: 665.
- WEIL-MALHERBE, H.: Ebenda 1937. 31: 299.
- WEIL-MALHERBE, H.: Ebenda 1937. 31: 2202.
- WEIL-MALHERBE, H. und KREBS, H. A.: Ebenda 1935. 29: 2077.
- WENDEL, W. B.: J. biol. Chem. 1931—32. 94: 717.
- WESTERKAMP, H.: Biochem. Z. 1933. 263: 239.
- WIELAND, H. und SONDERHOFF, R.: Ann. Chem. 1932. 499: 213.
- WIELAND, H. und SONDERHOFF, R.: Ebenda 1933. 503: 61.
- WISLICENUS, J.: Ebenda 1863. 126: 225.
- WISLICENUS, W. und WALDMÜLLER, M.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1911. 44: 1564.
- WOLFF, L.: Ann. Chem. 1898. 305: 154.
- WOLFF, L.: Ebenda 1901. 317: 1.
- WOODS, A.: Amer. J. Physiol. 1926—27. 79: 321.
-

ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. II. SUPPLEMENTUM IV.

---

Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Helsinki  
(Vorstand: P. E. SIMOLA)

UNTERSUCHUNGEN  
ÜBER DIE BILDUNG UND DEN  
ABBAU DER CITRONENSÄURE IM  
TIERISCHEN GEWEBE

VON

*NIILLO HALLMAN*

HELSINKI 1940



## INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
<i>Vorwort</i> .....	5
I. <i>Einleitung</i> .....	7
A. Über die Bedeutung der Citronensäure im tierischen Organismus .....	8
B. Theorien und frühere Untersuchungen über die Bildung und den Abbau der Citronensäure .....	12
II. <i>Methodik</i> .....	23
A. Die Behandlung der Gewebe und die Versuchsanordnung ..	23
B. Die Citronensäurebestimmung .....	25
1. Über Bestimmungsmethoden im allgemeinen .....	25
2. Die kolorimetrische Methode von PUCHER, SHERMAN, VICKERY .....	28
III. <i>Die Ergebnisse</i> .....	40
A. Die Citronensäurebildung in Gewebesuspensionen .....	40
1. Die Wirkung der äusseren Bedingungen auf die Citronensäurebildung .....	40
2. Der Einfluss verschiedener Säuren auf die Citronensäurebildung .....	61
3. Kombinationsversuche .....	73
4. Vergleichsversuche mit der enzymchemischen Citronensäurebestimmungsmethode von TRUNBERG .....	97
B. Der Citronensäureabbau in Gewebesuspensionen .....	101
1. Aconitase und iso-Citronensäure-Dehydrogenase .....	102
2. Der Einfluss der Gewebsgifte auf den Citronensäureabbau .....	106
3. Der Einfluss einiger wahrscheinlich als Baustoffe der Citronensäure in Frage kommender organischer Säuren .....	108



	Seite
C. Die Trennung der die Citronensäure bildenden und abbauenden Enzyme von einander .....	110
1. Die Beständigkeit der Enzyme im Gewebe .....	110
2. Dehydrasepräparate .....	111
3. Das Waschen des Gewebes .....	115
D. Das Vorkommen der Citronensäure in verschiedenen Geweben	119
IV. <i>Schlussbetrachtungen</i> .....	122
V. <i>Zusammenfassung</i> .....	127
VI. <i>Literaturverzeichnis</i> .....	131

## VORWORT.

Es ist mir eine angenehme Pflicht meinem verehrten Chef und Lehrer, Herrn Professor Dr. med. et phil. P. E. SIMOLA meinen aufrichtigsten Dank zu sagen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und sein unermüdliches Interesse und die zahlreichen Ratschläge, welche er mir im Verlaufe der Untersuchungen ohne eigene Mühe und Zeit zu sparen gegeben hat.

Gleichzeitig möchte ich med. lic. LARS HAGELSTAM danken, durch dessen Entgegenkommen es möglich wurde die Versuche mit der Thunberg-Methodik auszuführen.

NILO HALLMAN.



## I. Einleitung.

Die Citronensäure (CS) ist bekanntlich in der Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie schon lange Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Ihrer Bedeutung im tierischen Stoffwechsel ist dagegen erst im letzten Jahrzehnt grössere Beachtung zuteil geworden. In diesbezüglichen Untersuchungen hat man sich — dank der auf Anregung von THUNBERG vorgenommenen Arbeiten — besonders mit dem Vorkommen der CS in Gewebsflüssigkeiten unter normalen Bedingungen wie auch bei verschiedenen pathologischen Zuständen befasst. Auch was den eigentlichen Stoffwechsel anbetrifft, sind eine ganze Reihe neuer bedeutender Beobachtungen gemacht worden. Trotzdem bedarf aber der Stoffwechsel der CS, besonders was deren Bildung anbelangt, in grossem Umfang weiterer Klärung. Eine systematische Untersuchung über die CS-Bildung im tierischen Organismus in-vitro ist bisher noch nicht vorgenommen worden.

Den Anlass zu dieser im Jahre 1938 angefangenen Arbeit gaben einige von SIMOLA im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Brenztraubensäurestoffwechsel gemachte Befunde über die CS-Bildung, und von diesen ganz besonders die mit Brenztraubensäure und 4-C-Dicarbonsäuren im Gehirngewebe hervorgerufene Bildungswirkung.

Meine Absicht war es, in dieser Arbeit an Hand von systematischen in-vitro-Versuchen zu untersuchen, welche Verbindungen möglicherweise als Vorläufer der CS in Frage kommen und unter welchen Bedingungen und in welchen Geweben die CS-Bildung am besten vorsieht. Ferner wurde versucht aufzuklären, in welchem Grade die CS bei entsprechenden Versuchsbedingungen in Gewebesuspensionen in-vitro abgebaut wird und ob die aufbauenden und spaltenden Enzyme derselben von einander zu trennen sind. Da über das Vorkommen der CS in verschiedenen Geweben in der Literatur nur wenige Angaben vorliegen, wurde auch eine Reihe diesbezüglicher Bestimmungen vorgenommen.

## A. Über die Bedeutung der Citronensäure im tierischen Organismus.<sup>1</sup>

Der Gedanke an die vollständige Verbrennung der CS im tierischen Organismus stammt aus dem letzten Jahrhundert, in welchem PIOTROWSKY und MAGAWLY (1856) selbst nach Belastung mit Citrat keine CS im Harn nachweisen konnten.<sup>2</sup> Auch POHL (1896) gibt an, dass keine CS mit dem Harn ausgeschieden wird. OHTA (1912) sprach schon von CS-Ausscheidung, aber erst AMBERG und Mc CLURE (1917) stellten mit Sicherheit fest, dass die CS ein Normalbestandteil des Harns ist und dass täglich ca. 500 mg ausgeschieden werden. In zahlreichen späteren Untersuchungen ist dann die normale CS-Ausscheidung eingehender untersucht und gefunden worden, dass sie meist zwischen 200—1000 mg/24 St. schwankt.

Schon 1916 hatten jedoch SALANT und WISE nach Belastung mit Citrat CS im Harn, wenn auch in kleinen Mengen nachgewiesen. Später haben zahlreiche Forscher (u.a. WOODS, 1926—27; LEVI, 1928; ÖSTBERG, 1931; KUYPER und MATTILL, 1933; AXMACHER und SÜLLMAN, 1934; SCHUCK, 1934; SHERMAN, MENDEL und SMITH, 1936; SJÖSTRÖM, 1937; MÅRTENSSON, 1938; KRUSIUS, 1940) nach intravenösen, subcutanen oder peroralen CS-Belastungen nur eine schwache Zunahme der CS-Ausscheidung im Harn festgestellt.

Nachdem THUNBERG (1910) gezeigt hatte, dass die CS die Gewebsatmung in-vitro beschleunigt und BATELLI und STERN (1911) erklärt hatten, dass sie völlig verbrannt wird, haben u. a. BERNHEIM (1928), HARRISON (1931), GEMMIL (1934) und REICHEL und NEEF (1935) mit Trockenpräparaten, SCHERSTÉN (1936) mit Gewebsextrakten, LANGECKER (1934) mit Gewebesuspensionen und SJÖSTRÖM (1937) sowie MÅRTENSSON (1938) bei Perfusionsversuchen festgestellt, dass die die CS umsetzende Enzymgruppe im tierischen Organismus verhältnismässig reichlich vorhanden ist. Die erwähnten Versuche sind hauptsächlich mit Leber, Nieren und Muskel ausgeführt worden, und waren diese Gewebe in der angeführten Reihenfolge am wirksamsten. Nur MÅRTENSSON (1938) behauptet auf Grund seiner bei Katzen und Kaninchen erhaltenen Ergebnisse, dass die Nieren den grössten Teil abbauen.

Man nahm an, dass die Oxydation der CS durch eine spezi-

<sup>1</sup> Infolge der aussergewöhnlichen Verhältnisse wurde die Veröffentlichung dieser Arbeit verzögert; die Literaturübersicht umfasst daher nur die Untersuchungen bis Ende 1939.

<sup>2</sup> Referiert nach ÖSTBERG (1931).

fische, sie direkt angreifende Dehydrase, die THUNBERG (1920) nachgewiesen hatte, erfolge. MARTIUS und KNOOP (1937) und MARTIUS (1937, 1938) zeigten aber, dass deren Wirkung sich nicht unmittelbar auf die CS bezieht, sondern auf die aus dieser durch Einwirkung der Aconitase gebildete iso-CS. ADLER, EULER, GÜNTHER und PLASS (1939) haben iso-CS-Dehydrase mittels Aceton-Trockenpräparaten beim Schwein in Herzmuskel, Leber, Nieren, Pankreas, Eierstöcken, Darmschleimhaut, Muskel, Gehirn, Lungen, Testis, Jensen-Sarkom und in kleinen Mengen auch in der Milz nachgewiesen. JOHNSON (1939) wiederum hat das Vorkommen von Aconitase im Brustmuskel von Tauben und bei Ratten in Leber, Nieren, Lungen, Submaxillardrüsen, Gehirn, Darmschleimhaut und Testis konstatiert, dagegen aber nicht im Blut und in den roten Blutkörperchen. Ferner müssen noch die Untersuchungen von BREUSCH (1939) erwähnt werden, die ähnliche Resultate mit Ratten- und Kaninchengewebe ergaben.

Den ersten direkten Nachweis der Bildung von CS im Tierkörper erbrachten erst BOOTHBY und ADAMS (1934), als sie feststellten, dass die CS-Ausscheidung im Hungerzustande beim Hund zuerst sinkt aber nach genügend langem Fasten wiederum ansteigt, sogar zu grösseren Werten als normal, obgleich dem Organismus hierbei keine CS von aussen zugeführt wird. Ebenso rief die Leberexstirpation eine Abnahme der CS-Ausscheidung hervor, aber kurz vor dem Tode stiegen die Werte wieder an. Wenn man ferner das konstante Vorkommen der CS in den meisten tierischen Sekreten und Flüssigkeiten berücksichtigt, muss man heute die Bildung derselben im Tierorganismus als erwiesen ansehen. Dies um so mehr, als KREBS und JOHNSON (1937) und SIMOLA (1938) gezeigt haben, dass die CS in Gewebesuspensionen in Gegenwart gewisser Verbindungen entstehen kann.

Eingangs wurde schon erwähnt, dass die CS selbst nach grossen Belastungen im Harn nur in verhältnismässig geringen Mengen ausgeschieden wird. FASOLD (1930) und ebenso ÖSTBERG (1930, 1931) zeigten, dass die Alkalosis eine beachtenswerte Steigerung der Ausscheidung herbeiführt, während sie dagegen bei Vorhandensein eines Säureüberschusses beinahe völlig aufhört. Ferner haben auch MAGNUSSON (1932), SÜLLMAN und SCHAEERER (1932), LANG-ECKER (1933), KUYPER und MATTILL (1933), BOOTHBY und ADAMS (1934), FÜRTH, EDEL und MINNIBECK (1934), LINDHOLM (1934), SCHUCK (1934), SHERMAN, MENDEL und SMITH (1936), ORTEN und SMITH (1936, 1937), KRUSIUS (1940) festgestellt, dass der CS eine gewisse Bedeutung bei der Regulierung des Säure-Basen-Gleich-

gewichts zukommt. ÖSTBERG (1931) hat auch bemerkt, dass die CS-Ausscheidung bei Urämie, Nierenkrankheiten, diabetischer Acidose und manchmal bei Pneumonie vermindert ist, eine Beobachtung, die KRUSIUS und VESA (1939) bestätigen konnten. Eine andere Möglichkeit die Bedeutung der CS im Harn zu erklären, ist nach ÖSTBERG ein lösliches Calcium-CS-Komplex, welches das leicht ausfallende Calcium in Lösung hielt. Es gelang diesem Forscher aber nicht eine Kongruenz in der Ausscheidung dieser beiden Teilfaktoren nachzuweisen.

Im Blutserum sind von vielen Forschern ziemlich konstante Mengen CS gefunden worden. Ebenso wie der CS-Gehalt des Harns nach Belastungen nur wenig zunimmt, ist auch im Serum keine grössere Steigerung wahrzunehmen (THUNBERG, 1933; SHERMAN, MENDEL und SMITH, 1936; ORTEN und SMITH, 1937; SMITH und MEYER, 1939). SCHERSTÉN (1931) fand niedrigere Serumwerte als normal bei Fällen von Carcinom, Nierensteinen, Urämie und nach Operationen, vor allem bei postoperativer Thrombose. THUNBERG (1933) führte die Begriffe Hypo- und Hypercitricaemie ein. Er beobachtete ausser in den oben erwähnten Fällen auch bei inflammatorischen Prozessen subnormale Werte. Hypercitricaemie kommt dagegen bei Diabetes, Leberkrankheiten und manchmal bei Morbus Basedow vor. SJÖSTRÖM (1937) empfiehlt seinerseits Serum-CS-Bestimmung bei unklaren Leberkrankheiten zur Differentialdiagnose. Abhängend von der Schwere der Krankheit sah er bei Leberparenchymschäden in den meisten Fällen eine deutliche Steigerung des Blutspiegels. Bei Grenzfällen empfiehlt er Belastungsversuche, welche deutlicher die Unfähigkeit des Körpers die CS zu eliminieren zum Vorschein brächten. MÄRTENSSON (1938) behauptet jedoch, dass bei Leberparenchymkrankheiten die aus der Leber stammende Dehydrase die CS leichter als unter normalen Bedingungen zerstört. Dagegen soll die Fähigkeit der Nieren die CS zu verbrennen und auszuschcheiden auf Grund der bei Parenchymschäden auftretenden Toxine gestört sein; hierdurch würden die hohen Serumwerte bedingt und nicht direkt durch den Leberdefekt.

Bei einem Teil der angeführten pathologischen Zustände kann man die Veränderungen des CS-Gehalts des Serums durch Verschiebungen im Säure-Basen-Gleichgewicht erklären, genau wie für die Harnausscheidung auseinandergesetzt wurde. Der überwiegende Teil scheint aber auch auf andere Ursachen hinzudeuten. Schon früher wurde die CS wiederholt im Zusammenhang mit dem löslichen Calcium gebracht (SHIPLEY, KRAMER und HOWLAND, 1926; HASTINGS, MURRAY und SENDROY, 1926, 1927; GREENWALD, 1926).

Auch die bekannte Tatsache, dass die CS die Gerinnung des Blutes in hohem Grade verhindern kann, ist viel diskutiert worden, umso mehr als man feststellen konnte, dass sehr kleine CS-Mengen im Gegenteil die Gerinnung beschleunigen (LEAN, 1922; NEUHOFF und HIRSCHFELD, 1922; ROSENTHAL und BAEHR, 1922; MULLI und STANDENATH, 1933). Auch die Hemmung der Hämolyse durch kleine CS-Konzentrationen (PICKERING und DE SANZA, 1924; PICKERING und HEWITT, 1925) lässt sich nicht allein durch eine Zunahme der Alkalireserve erklären (DE SANZA und HAEKING, 1935).

Nach dem klassischen Versuch von HENKEL (1888) im Laboratorium von SOXHLET ist ausser in Kuhmilch auch wiederholt in der Milch der anderen Säugetiere CS in beachtenswerten Mengen nachgewiesen worden. Man hat angenommen, dass die Säure in der Milchdrüse gebildet wird, ihre Bedeutung in der Milch ist aber bisher nicht zufriedenstellend geklärt worden. U. a. dachte man auch in bezug auf die Milch, dass die Säure von Bedeutung wäre um das Calcium in Lösung zu halten (DUCLAUX, 1893; VAUDIN, 1894, 1897). JERLOW (1929) glaubte seinerseits, dass der junge Organismus besonders viel CS braucht, und untersuchte vor allem das Verhältnis zwischen CS und Milchzucker in der Milch. So enthält Kuhmilch dreimal mehr der Säure als Frauenmilch, weshalb man bei Vornahme von Milchmischungen nicht zu zu niedrigen Werten kommt, jedoch wird hierbei das mengenmässige Verhältnis zum Milchzucker gestört. Durch Hinzufügen von CS hat SIWE (1938) behauptet bei der Behandlung von Durchfällen gute Resultate erhalten zu haben, weil die Milch feinkörniger koaguliert würde, wenn das richtige Mengenverhältnis herrsche.

Auch die konstant höheren CS-Werte des Liquor cerebrospinalis als des Serums haben bisher noch keine Erklärung gefunden. Bei einigen Krankheiten wie z. B. Epilepsie und Gehirntumoren hat BENNI (1930) höhere Werte als normal festgestellt, während bei anderen, vor allem Arteriosklerose, vasculären Störungen, luetischen Prozessen und Meningitis zu niedrige Werte vorkommen, ohne dass aber eine sichere Gesetzmässigkeit hierin vorhanden wäre. Möglicherweise könnte man sich denken, dass die hohen Werte durch eine gesteigerte Verbrennung bedingt werden. Auch ist wieder auf die Löslichkeit des Calciums hingewiesen worden (HUGGINS und HASTINGS, 1933).

Beachtenswert ist ferner auch der CS-Gehalt der Augenflüssigkeiten vieler Tiere, der nach GRÖNVALL (1937) im wachsenden Organismus am grössten sein soll.



SCHERSTÉNS (1929, 1936) Untersuchungen mit Sperma deuten daraufhin, dass die CS hier eine ganz besondere Aufgabe hat. Wird dem Sperma oder einer Lösung desselben CS hinzugefügt bleiben die Spermatozoen länger am Leben und beweglich, ohne die CS zu verbrauchen. SCHERSTÉN behauptet, dass die CS nichts mit einem Puffersystem zu tun hat sondern, dass sie eventuell die Ausfällung des nötigen Calciumphosphates verhindert. Möglich ist auch, dass die CS als Produkt des Spermatozyten-bildenden Parenchyms schon ihre Aufgabe erfüllt hat, ehe das Sekret in die Ausführungsgänge gelangt.

Was die Bedeutung der CS im eigentlichen Stoffwechsel anbelangt, gibt das folgende Kapitel über den Umsatz-Mechanismus am besten Aufschluss über die ihr zugedachte Rolle bei den Verbrennungsvorgängen im Organismus.

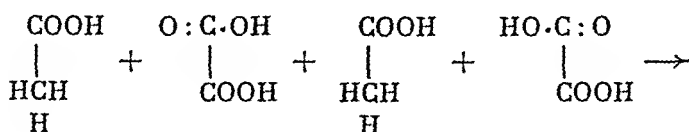
## B. Theorien und frühere Untersuchungen über die Bildung und den Abbau der Citronensäure.

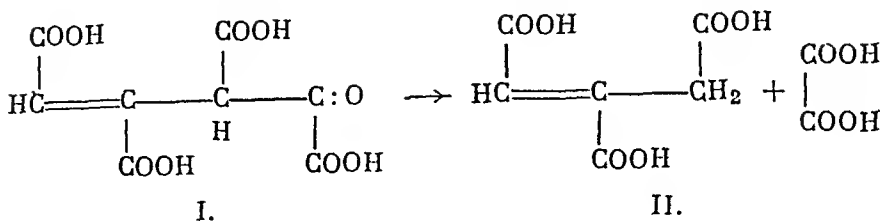
### I. Mikroorganismen und Pflanzen.

Schon bevor die Probleme über den Umsatz der CS bei höheren Tieren in den Brennpunkt des Interesses traten, war bekannt, dass sie eine Bedeutung im Stoffwechsel der Pflanzen und besonders der Schimmelpilze und der Hefe hat. Da die Untersuchungen über dieses Gebiet viel umfangreicher sind als diejenigen über den Umsatz im Tierorganismus und, da man immer an eine mögliche Parallelität denken muss, scheint es angebracht eine kurze Übersicht über die wichtigsten Versuche und die hieraus abgeleiteten Theorien der CS-Bildung und Spaltung zu geben.

Die Fähigkeit der Schimmelpilze aus Zucker CS zu bilden beobachtete als erster WEHMER (1893). Besonders kamen hier in Frage die Aspergillus- und Penicilliumarten. Der CS-Gehalt höherer Pflanze war schon früher, seitdem SCHEELE (1784) die Säure aus Citronen isoliert hatte, bekannt.

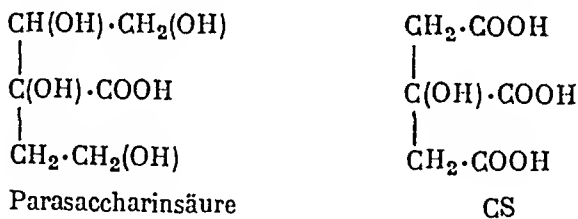
CLAISEN und HORI hatten schon (1891) angenommen, dass die CS aus Oxal- und Essigsäure gebildet würde, welche beide nach BUCHNER und WÜSTENFELD (1909) als Spaltungsprodukte des Zuckers anzusehen sind. Als Zwischenprodukte entstehen nach den zuletzt genannten Forschern zuerst Aconitoxalsäure (I) und dann Aconitsäure (II):



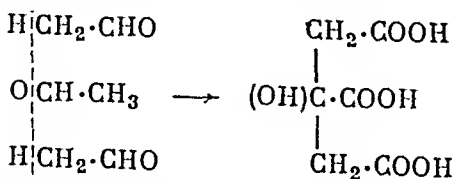


MAZÉ und PERRIER (1904) behaupteten, dass Eiweisskörper bei der CS-Bildung die hauptsächlichste Rolle spielen. Die Schimmelpilze oxydieren erst den Zucker zu Kohlendioxyd und Äthylalkohol durch Wirkung der Zymase. Der entstandene Alkohol soll sich mit der lebenden Masse der Zellen verbinden, die dann durch proteolytische Prozesse, wenigstens in den gealterten Zellen, zu Stickstoff-haltigen Verbindungen und CS gespalten wird. Die CS soll aber auch schon vorher auf die eine oder andere Art im Plasma gebildet werden. KOSTYSCHEW und TSCHESNOKOW (1927) sowie SCHROBER (1931) behaupten ebenfalls, dass der Stickstoff irgendeine Bedeutung bei der CS-Bildung hat, aber CURZASZCZ und TIUKOW (1931) erklären, dass es sich hierbei nur um den Stickstoffbedarf der Pilze im allgemeinen handelt.

Die Möglichkeit der Bildung der CS aus Parasaccharinsäure haben KNOOP und WINDAUS (1905) in Erwägung gezogen, nachdem KILIANI (1904) gezeigt hatte, dass diese Verbindung neben anderen Spaltungsprodukten aus Milchzucker entsteht. Zu demselben Ergebnis kommt auch BUTKEWITSCH (1923), der jedoch annimmt, dass das Hexose-Molekül gespalten wird vor der Bildung der Parasaccharinsäure.

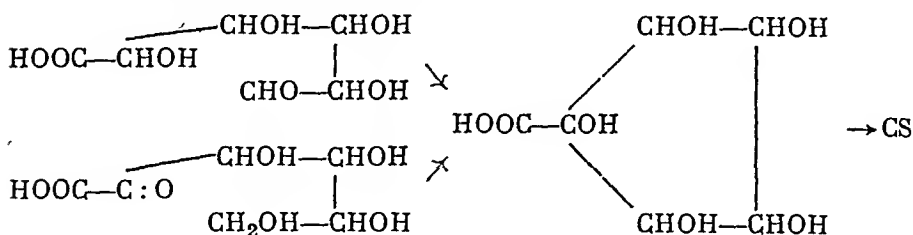


v. EULER (1909) hat die CS-Bildung in Zusammenhang zu der Alkoholgärung gebracht, indem er annahm, dass die Säure direkt durch Kondensierung dreier Moleküle Acetaldehyd entstände:

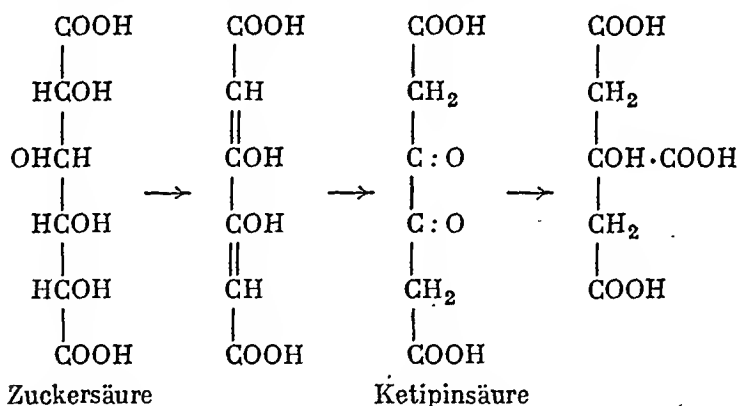


BAUR (1913) fasste seinerseits die CS als Kondensationsprodukt von Glycolsäure auf; doch ist auch diese Hypothese chemisch wie physiologisch unbewiesen.

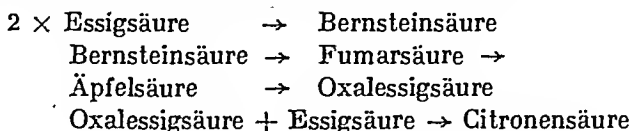
BUTKEWITSCH (1924) hält es für möglich, dass die aus Hexosen durch Aldolkondensation gebildeten cyklischen Verbindungen Ausgangsprodukte der Synthese sein können, wobei zuerst aus Glucuronsäure (FALCK, 1924) Glucuronsäure gebildet würde:



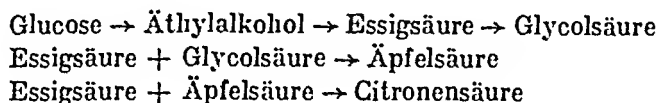
FRANZEN und SCHMITT (1925) haben als Zwischenprodukt Ketipinsäure ( $\beta, \gamma$ -Diketoadipinsäure) isoliert und behaupten, dass die Synthese der CS aus Glucose über Zucker- und weiter Ketipinsäure verlief. CHALLENGER, SUBRAMANIAM und WALKER (1927) behaupten auch experimentell aus Zuckersäure CS erhalten zu haben.



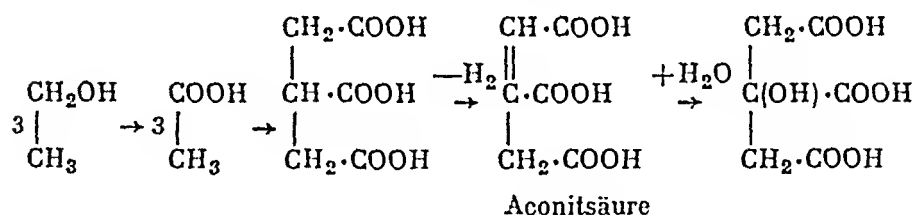
RAISTRICK und CLARK (1919) erwähnen zum ersten Mal die Essigsäure zusammen mit der Oxalessigsäure als Vorläufer der CS, da sie beide Verbindungen unter den Spaltungsprodukten der CS fanden. Sie nehmen an, dass die Bildung möglicherweise auf demselben Wege vorsichgehen könnte. Zu dem gleichen Schlussatz kamen auch VIRTANEN und PULKKI (1930). WIELAND und SONDERHOFF (1932) erhielten aus Natriumacetat Bernsteinsäure und daneben auch CS. Die Bildung der CS aus 4-C-Dicarbonsäuren, genauer gesagt aus Fumarsäure, beobachteten früher u. a. WEHMER (1913), EHRLICH (1919) und BUTKEWITSCH und FEODOROFF (1929). Die Reaktionsfolge kann folgender Weise bezeichnet werden:



Nach CHRZASZCS, TIUKOW und ZAKOMORNY (1932) soll der Weg von Glucose zu CS über Äthylalkohol und Essigsäure zu Glycolsäure verlaufen, die mit einem Molekül Essigsäure zu Oxalessigsäure aufgebaut würde; schliesslich würde diese Dicarbonsäure mit einem weiteren Molekül Essigsäure zu CS vereinigt:

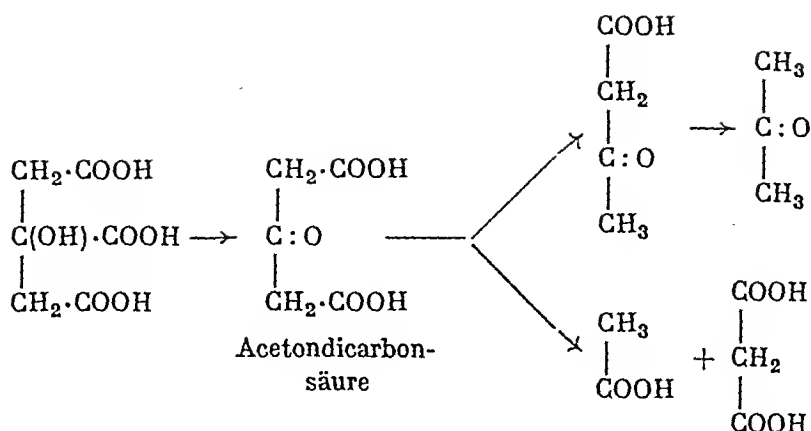


In Übereinstimmung mit der schon seinerzeits von MAZÉ und PERRIER (1904) vertretenen Ansicht haben BUTKEWITSCH und FEODOROFF (1930) BERNHAUER und SIEBENÄUGER (1931), CHRZASZCS und TIUKOW (1931) und BERNHAUER, BÖCKL und SIEBENÄUGER (1932) den Alkohol als möglichen Ausgangsstoff bei der CS-Bildung nachgewiesen; für die Bildung aus Essigsäure traten ausserdem CHRZASZCS und TIUKOW (1930, 1931), BERNHAUER und SIEBENÄUGER (1931) und BERNHAUER und BÖCKL (1932) ein. Auch aus Bernsteinsäure zusammen mit Glycolsäure, dem ersten Oxydationsprodukt der Essigsäure, erhielten BERNHAUER und SCHEUER (1932) CS. Auf Grund der angeführten Versuchsergebnisse glaubt BERNHAUER (1933), dass die CS bei der Alkoholgärung direkt aus der entstandenen Essigsäure synthetisiert wird, wobei drei Moleküle zusammen reagieren würden. Als Zwischenglied entstande Aconitsäure, die von BERNHAUER und BÖCKL (1932) auch als CS-Bildner nachgewiesen wurde:



Jedoch schliesst BERNHAUER auch nicht die Möglichkeit aus, dass CS aus Essigsäure zusammen mit einer 4-C-Dicarbonsäure aufgebaut werden könnte. — Als weitere möglichen Vorläufer der CS wurden u. a. Glycerinsäure (HERZOG und POLOTZKY, 1909; WENNER, 1913; SCHREYER, 1925), Muconsäure (CHALLENGER, SUBRAMANIAM und WALKER, 1927; WALKER und KLEIN, 1928) und Adipinsäure (dieselben) berücksichtigt.

Was den Abbau der CS anbetrifft, wurde im allgemein angenommen, dass er über Acetondicarbonsäure verlief, die u. a. von WALKER, SUBRAMANIAM und CHALLENGER (1927) isoliert wurde. Die weitere Oxydation ginge dann zwei verschiedene Wege vorsich. Aus der Acetondicarbonsäure würde über Acetessigsäure Aceton gebildet oder aber Malon- und Essigsäure (BOSWORTH und PRUCHER, 1911; CHALLENGER, SUBRAMANIAM und WALKER, 1927, 1928):



Im Gegensatz haben WIELAND und SONDERHOFF (1932, 1933) und SONDERHOFF (1936) sowie MÜLLER (1935) keine Acetondicarbonsäure finden können. MARTIUS (1938) denkt, dass anstatt Acetondicarbonsäure  $\alpha$ -Ketoglutar säure möglicherweise auch bei niederen Organismen die erste Abbau produkt der CS wäre. — Ferner ist auch an die Möglichkeit gedacht worden, dass der Abbau der CS über Oxalessigsäure (BERNHAEUER, 1933) oder über Aconitsäure (TERADA, 1924) verlief.

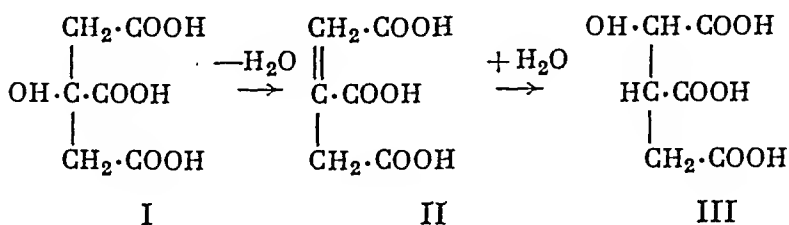
## 2. Tierorganismus.

Über die experimentellen Nachweise der Verbrennung und der Bildung der CS im Organismus höherer Tiere wurde schon im vorhergehenden Kapitel berichtet. REICHEL und NEEF (1935) erhielten bei Umsetzung von CS in Leberpräparaten in Übereinstimmung mit den oben angeführten Versuchen Acetondicarbonsäure. Auch LANGECKER (1934) bemühte sich um den Nachweis der Bildung von Acetondicarbonsäure, hatte aber keinen sicheren Erfolg. Von vielen Forschern wurde angenommen, dass der Abbau der CS zu Acetondicarbonsäure durch die von THUNBERG gefundene Dehydrase bewirkt würde, aber WAGNER-JAUREGG und RAUEN (1935) konnten nicht mit aus Leber isolierten Dehydrasepräparaten die Bildung dieser Säuren nachweisen, ebensowenig wie zugesetzte Acetondicarbonsäure von der Dehydrase abgebaut wurde, was man auf Grund der biologischen Reaktionen hätte annehmen können. Im Zusammenhang mit diesen Versuchen wurde aber die erstaunliche Tatsache festgestellt, dass die Dehydrase die iso-CS schneller abbaut als die CS.

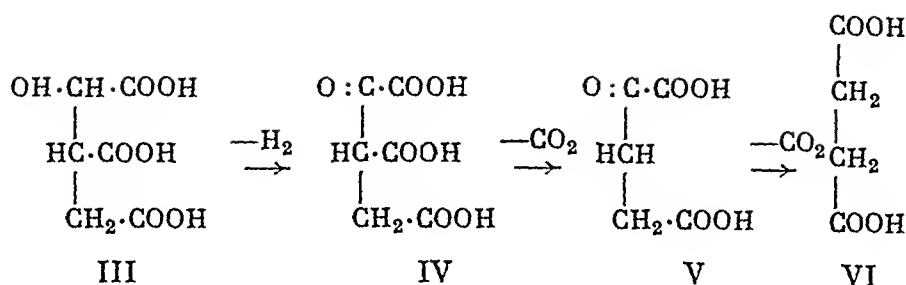
Nachdem MARTIUS und KNOOP (1937) mit Dehydrasepräparaten aus CS  $\alpha$ -Ketoglutar säure und Bernsteinsäure erhalten hatten, stellten sie die Theorie auf, dass der Abbau der CS nicht über Acetondicarbon säure sondern über cis-Aconitsäure (MALACHOWSKI

und MASLOWSKI, 1928), iso-CS, Ketotricarballylsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure zu Bernsteinsäure verlief. Die Wirkung der Dehydrase bezöge sich dementsprechend garnicht auf die CS selbst sondern auf die aus ihr entstandene iso-CS. Auch KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) gelang es durch Vergiftung der Gewebe mit Arsenigsäure  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Bernsteinsäure zu isolieren. MARTIUS (1937) hat weitere Beweise für diese Theorie gefunden, indem es ihm gelang mittels der Gurkensamen-Dehydrase aus cis-Aconitsäure auch rückläufig CS darzustellen. Ferner konnte dieser Forscher auch bei Verwendung von Selenit aus Leber- und Muskelpräparaten als Spaltungsprodukt der CS optisch aktive iso-CS isolieren, da das Selenit die Wirkung der Dehydrase verhinderte. Das Gleichgewichtsverhältnis in biologischen Flüssigkeiten zwischen CS und iso-CS soll nach MARTIUS (1938) 10: 1 sein, während JOHNSON (1939) behauptet, dass die iso-CS ganze 16 % ausmache. — Was den Acetondicarbonsäurebefund von REICHEL und NEEF (1935) in Leberpräparaten anbetrifft, erklärt MARTIUS (1937), dass er auf Fehlerquellen in den Bestimmungsmethoden beruhe. Auf die gleiche Art kann man möglicher Weise auch die bei niedrigeren Organismen gefundene Acetondicarbonsäure in Frage stellen. Es scheint nicht ausgeschlossen, dass auch hier der CS-Abbau den selben Weg verläuft wie im Stoffwechsel höherer Tiere.

Nach der heute vorherrschenden Ansicht geht der Abbau der CS im Gewebe in zwei Phasen vor sich. Erst wird die CS (I) durch eine Hydratase, die Aconitase zu cis-Aconitsäure (II) verwandelt und diese dann weiter zu iso-CS (III):



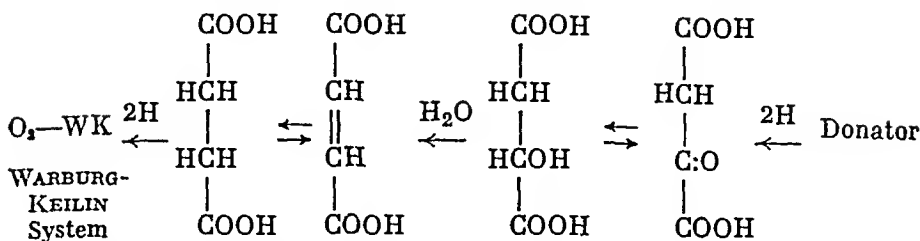
Die Wirkung der eigentlichen Dehydrase bezieht sich erst auf die iso-CS, in Wirklichkeit handelt es sich also um eine iso-CS-Dehydrase. Das erste Zwischenprodukt ist die Ketotricarballyl- oder Oxalbernsteinsäure (IV), aus der durch Decarboxylierung  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (V) entsteht. Von dieser geht es dann weiter zu Bernsteinsäure (VI):



Was den weiteren Abbau der Bernsteinsäure angeht, hat schon EINBECK (1919) gezeigt, dass aus ihr durch Dehydrierung Fumarsäure und dann weiter l-Äpfelsäure entsteht, wobei das endgültige Mengenverhältnis zwischen den zwei zuletzt genannten Säuren nach DAKIN (1923) 1: 3 sein soll. Das folgende Glied in der Oxydationskette ist Oxalessigsäure, deren Isolierung viel Schwierigkeiten bereitet hat. BANGA (1935, 1936) gelang es jedoch nach Zusatz von Arsenit und Hydrazin aus l-Äpfelsäure Oxalessigsäure darzustellen und zu isolieren; schon früher hatten aber HAHN, HAARMANN und FISCHBACH (1929) und HAHN (1930) gewisse Beweise für diese Reaktionsfolge gebracht. GREEN (1936) gibt an, Oxalessigsäure am sichersten im Herzmuskel von Ratten, Kaninchen, Tauben und Meerschweinchen nach Zusatz von l-Äpfelsäure gefunden zu haben.

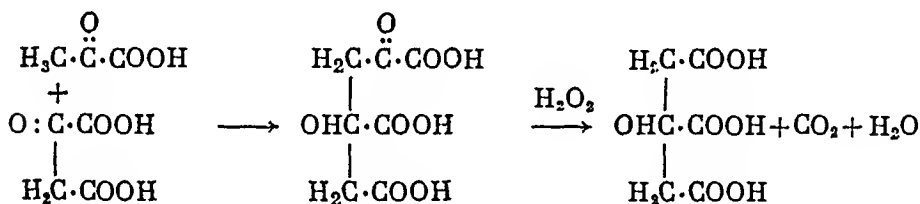
MAYER (1914) und HAHN und HAARMANN (1928, 1929) kamen an Hand von Versuchen zu dem Resultat, dass die Oxalessigsäure im Tierorganismus weiter decarboxyliert wird, wobei Brenztraubensäure entsteht. STRAUB (1936), LAKI (1936) und BREUSCH (1939) behaupten aber, dass der grösste Teil der Oxalessigsäure zu Äpfelsäure und Fumarsäure zurück verwandelt wird und dass die von den erwähnten Forschern gefundene Brenztraubensäure nur ein Spaltungsprodukt von Zucker sei. BANGA und v. SZENT-GYÖRGYI (1936) meinen jedoch, dass ein Teil decarboxyliert wird. v. SZENT-GYÖRGYI'S Schule, zu der diese Autoren gehören, erklärt (1934—1936), dass die 4-C-Dicarbonensäuren bei der Zuckerverbrennung katalytisch wirken und dass sie zusammen mit dem System von WARBURG-KEILIN den Weg bilden, auf welchem der Wasserstoff der verschiedenen Donatoren auf die Säuren übertragen wird. Nur in Gegenwart eines Überschusses wird ein Teil der 4-C-Dicarbonensäuren oxydiert (ANNAU und STRAUB, 1937), aber trotzdem bleibt das Verhältnis Fumarsäure:l-Äpfelsäure unverändert (BREUSCH 1937).

v. SZENT-GYÖRGYI (1937) hat die Bedeutung der 4-C-Dicarbonensäuren für die Gewebsatmung folgenderweise erklärt:

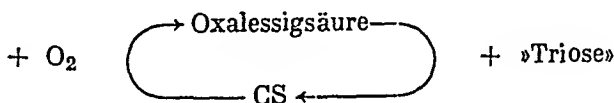


BREUSCH (1937) hat auch die Bedeutung der CS und anderer 6-C-Tricarbonsäuren für die Gewebsatmung auf analoge Art und Weise zu erklären versucht, ohne aber irgendwelche Beweise für seine Theorie anzuführen.

Im Jahre 1936 konstatierten KNOOP und MARTIUS, dass bei der Oxydation von Oxalessigsäure zusammen mit Brenztraubensäure mit Wasserstoffsperoxyd CS entsteht. In 5 % Lösung erhielten sie nach 20—30 stündlicher Reaktion bis zu 35 % der theoretischen Ausbeute. Sie nehmen an, dass sich die beiden Säuren erst zu einem Komplex kondensieren, von dem bei der Oxydation Wasser und Kohlendioxyd abgespalten wird, wobei CS gebildet wird:



Abweichend von der angeführten Reaktionsfolge nahmen KREBS und JOHNSON (1937) an, dass die CS aus Oxalessigsäure zusammen mit einer Triose gebildet würde und führen als Stütze hierfür ihre mit Taubenbrustmuskel ausgeführten Versuche an. Später kamen KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) jedoch zu der Auffassung, dass die Brenztraubensäure möglicherweise an Stelle der Triose an der Reaktion teilnehmen kann. Die gebildete CS werde dann wieder über 4-C-Dicarbonsäuren zu Oxalessigsäure verbrannt, welche letztere von neuem mit einer Triose (bzw. Brenztraubensäure) reagiere. Durch diesen Umsatzzyklus werde der Zucker allmählich oxydiert:



BREUSCH (1937) jedoch behauptet, dass die mit Oxalessigsäure erhaltenen CS-Werte von dem bei der Neutralisierung gebildeten



Komplex herrühren und nicht enzymatisch entstanden seien. Später (1939) erhielt er in Rattennierengewebe positive Resultate, jedoch sind ihm anscheinend die früheren Untersuchungen von SIMOLA, HALLMAN und ALAPEUSO (1939) und HALLMAN (1939)<sup>1</sup> entgangen, bei welchen auch andere 4-C-Dicarbonsäuren zusammen mit Brenztraubensäure im Rindergewebe starke CS-Bildung hervorriefen.

KREBS und JOHNSON (1937) stützen ferner ihre Cyklustheorie auf die Beschleunigung der Gewebsatmung durch CS, welche seiner Zeit von THUNBERG (1910) und später von BATELLI und STERN (1911, 1914) und ABDERHALDEN und WERTHEIMER (1921) gefunden wurde. BREUSCH (1937) konnte diesen Effekt aber nicht konstatieren. — Auch der Befund von KREBS und EGGLESTON (1938), dass das Insulin in Gegenwart von CS die Gewebsatmung steigert, deutet daraufhin, dass die CS etwas mit der Zuckerverbrennung zu tun hat. Später haben SHORR und BARKER (1939) diesen Effekt bestätigen können, aber nur mit Taubenbrustmuskel.

Was in-vitro-Versuche mit verschiedenen Geweben anbetrifft, ist die Beobachtung von SIMOLA (1938), nach der die CS im Rindergehirn neben anderen Verbindungen als ein Umsatzprodukt der Brenztraubensäure auftritt, wichtig. Schon früher hatten HAHN und HAARMANN (1929) die entgegengesetzte Reaktion, nämlich die Bildung von Brenztraubensäure bei der Oxydation der CS beobachtet und als direkte Dehydrierung erklärt. Weitere Versuche von SIMOLA (1938), SIMOLA und ALAPEUSO (1938) und SIMOLA und HALLMAN (1938) und HALLMAN (1938) haben gezeigt, dass ausser den schon erwähnten Vorläufern der CS auch die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, l-Äpfelsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Acetessigsäure, Buttersäure und Maleinsäure Anlass zu CS-Bildung geben. Ausser den Cyklussäuren handelt es sich also um Abbauprodukte der Fette. Als eventuellen Weg für die CS-Bildung haben SIMOLA und ALAPEUSO (1938) anfangs ausser der Reaktion von Oxalessigsäure mit Brenztraubensäure die Kondensation zweier Moleküle Oxalessigsäure mit anschliessender Decarboxylation in Erwägung gezogen. Die Bildung aus  $\beta$ -Oxybuttersäure könnte möglicherweise zum Teil über Äpfelsäure verlaufen, wobei die entständige Methylengruppe zur Carboxylgruppe oxydiert würde.

In den letzten Jahren vorgenommene in-vivo-Versuche zeigen auch, dass die 4-C-Dicarbonsäuren etwas mit der CS-Bildung zu tun haben. Derart fanden ORTEN und SMITH (1937, 1938, 1939) dreissig-

<sup>1</sup> Im Zusammenhange mit dieser Arbeit.

bis vierzigfache Steigerung der CS-Ausscheidung mit dem Harn nach intravenöser Verabreichung von Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure. KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) haben bei Ratten und Kaninehen entsprechende Resultate erhalten. Sie erklären das ebenfalls positive Resultat nach Verabreichung von Maleinsäure und Malonsäure durch Vergiftung der die CS abbauenden Enzyme. SIMOLA (1938), SIMOLA, KRUSIUS und ALAPEUSO (1938), SIMOLA und KOSUNEN (1938), SIMOLA und KRUSIUS (1939) und KRUSIUS (1940) haben bei Ratten, Kaninehen, Meerschweinchen und beim Menschen auch noch nach Belastung mit anderen Säuren, wie z. B. Brenztraubensäure, Brenztraubensäurealdol,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Iso- und Normobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Glutarsäure, Citraconsäure und Aconitsäure Zunahme der CS-Ausscheidung beobachtet, die die entsprechende Alkaliwirkung deutlich überstieg. Es mag ferner noch erwähnt werden, dass FÜRTH, MINNIBECK und EDEL (1934) bei einem Jungschwein vermehrte CS-Ausscheidung nach Verabreichung von Natriumacetat sahen. Dieser Effekt konnte aber in den anderen angeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden.

MÄRTENSSON (1938), der bei Untersuchung des arteriellen und venösen Blutes und bei Perfusionsversuchen mit Leber und Nieren von Kaninehen und Katzen den stärksten CS-Verlust in den Nieren fand, behauptet, dass auch die durch Äpfelsäure erhaltene CS-Steigerung im Blut nur scheinbar sei. Die hohen Werte bei den Belastungsversuchen würden nur durch die vergiftende Wirkung grosser Äpfelsäuremengen auf das Oxydationssystem der CS bedingt. Bei intravenöser Verabreichung von Äpfelsäure beobachtete er (1939) zwar eine Zunahme der Blut-CS, besonders in den Renalvenen, genauso wie SMITH, ORTEN, JOHNSTON und BANGUETT (1939), aber er macht geltend, dass die Fähigkeit der Nieren CS abzubauen entsprechend vermindert sei. Bei Perfusionsversuchen bekommt zwar MÄRTENSSON CS aus Äpfelsäure, aber auch hierbei soll der Zusatz der Säure nur eine Abnahme der CS-Spaltung hervorrufen.

Ausser mit den Kohlenhydraten und teilweise mit den Abbauprodukten der Fette ist die CS auch in Verbindung mit den Aminosäuren gesetzt worden. Bekanntlich entstehen bei der Desaminierung derselben Ketosäuren, so z. B. aus Glutaminsäure  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (KNOOP, 1931; KREBS, 1933). Diese Reaktion ist reversibel, wie v. EULER, ADLER, GÜNTHER und DAS (1938) und KREBS und COHEN (1939) gezeigt haben. Andererseits entsteht die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, wie erwähnt, auch aus CS. BRAUNSTEIN und KRITZMANN

(1937), KRITZMANN (1938) und BRAUNSTEIN (1939) haben nachgewiesen, dass die Aminogruppe der Glutaminsäure auf andere Ketosäuren übertragen werden kann, und COHEN (1939), dass eine derartige Umaminierung auch zwischen anderen entsprechenden Säuren stattfinden kann. SIMOLA und ALAPEUSO (1939) glauben, dass wenigstens ein Teil der durch Zusatz von Brenztraubensäure entstandenen  $\alpha$ -Ketoglutarsäure durch Umaminierung gebildet wird, ebenso wie ein Teil der ebenfalls vorgefundenen CS aus der durch Umaminierung entstandenen Oxal-essigsäure. ADLER, EULER, GÜNTHER und PLASS (1939) geben der CS bei der Aminosäuresynthese des Organismus eine sehr wichtige Aufgabe, nachdem sie aus Herzmuskel die iso-Citrico-Apodehydrogenase und die Glutaminsäure-Apodehydrogenase isolierten, welche letztere unter gewissen Bedingungen in Gegenwart von Ammoniak auch die reductive Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bedingt.

## II. Methodik.

### A. Die Behandlung der Gewebe und die Versuchsanordnung.

In den vorgenommenen Versuchen wurde Rindergewebe verwendet. Dies aus dem Grunde, weil es leicht und in genügenden Mengen zu erhalten war. Wegen der Grösse der einzelnen Organe ist es am geeignetsten zu derartigen Serienbestimmungen, indem es konstante Vergleichsbedingungen ermöglicht. Ferner können zu jedem Versuch grössere Mengen Gewebe benutzt werden, wodurch schon kleine Unterschiede in den CS-Werten deutlich zum Vorschein kommen.

Das Gewebe wurde täglich unmittelbar nach dem Schlachten der Tiere aus der Schlächtereie geholt, meist verstrich bis zum Beginn des Versuchs durchschnittlich 1—2 Stunden. Wie später gezeigt wird, werden weder die die CS spaltenden noch die sie aufbauenden Enzyme besonders leicht zerstört, selbst nicht im Verlaufe mehrerer Tage, so dass diese kurze Zeitspanne bis zum Beginn des Versuchs keine nennenswerte Bedeutung hat. Die gleichzeitig vorgenommenen Versuche (d. h. eine Serie) sind jedenfalls ohne Einschränkung mit einander vergleichbar, unabhängig davon, ob seit dem Schlachten eine etwas längere oder kürzere Zeit verflossen ist. Selbst wenn wir also denken, dass die Zeit auf die eine oder andere Art schwächend auf den Verlauf der Reaktionsvorgänge einwirkt, ist dies gleichgültig bei der Beurteilung der Ergebnisse.

Nachdem das Fett und Bindegewebe sorgfältig entfernt war, wurde das Gewebe unmittelbar in einer vorher eisgekühlten Mühle fein gemahlen und dann noch gut vermischt. Die zu jeder Bestimmung notwendige Gewebemasse wurde dann auf fertig tarierten und ebenfalls eisgekühlten Uhrgläschen gewogen. Gewöhnlich wurde zu jeder Bestimmung, wenn nicht anders angegeben ist, 20 g Gewebsbrei verwendet.

Schon vor dem Eintreffen der Gewebe aus der Schlächtereie wurde vorbereitend in 200 cm<sup>3</sup> fassende Erlenmeyerflaschen 50 cm<sup>3</sup> Pufferlösung, gewöhnlich 1 % Natriumbicarbonat pipetiert und die für jeden Versuch bezweckte Säure, als neutrales Natriumsalz in 10 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Bei Untersuchungen über den Abbau der CS wurde demgemäss CS zugesetzt, bei Bildungsversuchen wiederum die jeweils in Frage kommende Muttersubstanz.

Der gewogene Gewebsbrei wurde dann unter Schütteln hinzugegeben. Unmittelbar im Anschluss hieran wurde durch die Flaschen Sauerstoff oder Stickstoff geleitet, abhängig davon ob die Versuche aerob oder anaerob vorgenommen wurden. Das Gas wurde 15 Minuten, durch alle Flaschen gleichzeitig, geleitet. Anschliessend wurden die Flaschen luftdicht verschlossen und in den Thermostat (37° C) gesetzt. Nach genügend langer Bebrütung wurde das Eiweiss durch Ausfällung mit 20 cm<sup>3</sup> 20 % Trichloressigsäure entfernt.

Die Einleitung des Sauerstoffs geschah direkt aus einer Gasbombe. Der Stickstoff wurde dagegen zur Entfernung der letzten Sauerstoffreste mindestens 24 Stunden in einer grossen Flasche über Phosphorpentoxyd aufbewahrt, wonach er mittels Wasserdruck durch Waschflaschen mit Schwefelsäure und Wasser in die Erlenmeyerkolben geleitet wurde.

Die CS-Bestimmung wurde in dem Eiweiss-freien Filtrat ausgeführt. Es leuchtet ohne weiteres ein, dass die gleichzeitig angesetzten Versuche direkt miteinander verglichen werden können. Da die Gewebe selbst eine gewisse Menge CS enthalten ist parallel mit jeder Versuchsreihe eine Blindprobe vorgenommen worden, bei der das Eiweiss schon vor der Gaseinleitung ausgefällt wurde. Da ferner festgestellt wurde, dass in allen Gewebesuspensionen bei alkalischer Pufferung etwas CS gebildet wird, wurde auch immer eine s. g. Nullprobe ausgeführt, d. h. einer Erlenmeyerflasche wurde keine Säure zugesetzt. Derart kann die in dem Gewebe vorhandene und die bei den beschriebenen Versuchsbedingungen spontan entstehende CS eliminiert werden.

Sowohl bei Untersuchung der CS-Bildung als auch bei Versuchen über deren Abbau wurden die Bestimmungen in einem aliquoten Teil des Eiweiss-freien Filtrats vorgenommen. Derart wurde festgestellt ob der CS-Gehalt der Suspension ab- oder zunahm.

Bei Bestimmung des CS-Gehalts des Gewebes wurde etwas anders verfahren. Anstatt das Gewebe in einer gewöhnlichen Fleischmühle zu mahlen, welches Vorgehen bei den anderen Versuchen zur möglichsten Abkürzung des Zeitverlustes nötig war, obwohl der Gewebsbrei hierbei etwas gröber verblieb, wurde das Gewebe in der Latapi-Mühle zerkleinert. Anschliessend hieran wurde es noch in einem Mortel mit Sand verrieben, wobei allmählich 20 cm<sup>3</sup> Wasser hinzugerührt und schliesslich das Eiweiss mit Trichloressigsäure ausgefällt wurde. Bei diesen Bestimmungen wurden meist nur 10 g Gewebe verwendet. Nach einstündigem Stehen wurde das Reiben im Mortel wiederholt. Die Bestimmung wurde schliesslich wieder aus einem aliquoten Teil des Filtrats ausgeführt.

In denjenigen Geweben, in denen sich 10 g als zu grosse Ausgangsmenge erwiesen, wie beispielsweise die Milchdrüse und Schilddrüse, wurde zur Verreibung im Mortel nur 0.5—1 g verwendet. Hierbei wurde weniger Flüssigkeit zugesetzt und nach dem Filtrieren wurde die Fällung mit insgesamt 30 cm<sup>3</sup> 5 % Trichloressigsäure in Portionen von 5 cm<sup>3</sup> gewaschen. Dieses Waschen der Fällung erwies sich als ausreichend, da das letzte Washwasser keine Spuren CS mehr enthielt.

## B. Die Citronensäurebestimmung.

### 1. Über Bestimmungsmethoden im allgemeinen.

Die ersten CS-Bestimmungen wurden durch Ausfällung mit schweren Metallsalzen vorgenommen, von denen anfangs Calcium am gewöhnlichsten war. Auch Barium wurde zu dem selben Zwecke verwendet. Da aber feststeht, dass im tierischen Organismus viele Verbindungen vorkommen, die unter denselben Bedingungen ausgefällt werden, hat dieses Verfahren neueren, mehr spezifischen Methoden weichen müssen. Trotzdem wird auch heute noch das Barium- oder Calciumsalz der CS zur Isolierung und genaueren Identifizierung derselben verwendet.

Die erste spezifische CS-Bestimmungsmethode basiert auf der Beobachtung von STAHR (1897), dass bei der Oxydation der Säure mit Kaliumpermanganat eine rotbraune Fällung gebildet wird, welche WÖHLK (1902) als Pentabromaceton identifizieren konnte und zu CS-Ermittlungen in der Milch verwendete. Anfangs glaubte man, dass die CS direkt zu Aceton oxydiert werde, welches dann mit Brom eine zu quantitativen Bestimmungen geeignete Fällung bilde. Später wurde jedoch gezeigt, dass bei der Oxydation zuerst Acetondicarbonsäure gebildet wird, welche sich mit Brom als schwerlösliches Pentabromaceton ausfällt.

Diese Methode hat sich als praktisch und vor allem ziemlich spezifisch erwiesen. Im Laufe der Zeit sind eine ganze Reihe Modifikationen derselben entstanden. KUNZ (1915) berichtet, dass die Weinsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure und Milchsäure sowie Glycerin nicht bei der Reaktion stören. AMBERG und Mc CLURE (1915) fanden ferner, dass ausser diesen Verbindungen auch die  $\beta$ -Oxybuttersäure, Harnsäure, Brenztraubensäure, Tricarbalylsäure, Aconitsäure, Itaconsäure, Citraconsäure, Mesaconsäure und Glucose keinen Einfluss auf die ermittelten CS-Werte haben. COMETIANI (1931) erklärt auch die iso-CS, cis-Aconitsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure, die 4-C-Dicarbonensäuren und die Acetonkörper als nicht störend. Dagegen wird natürlich das Oxydationsprodukt der CS die Acetondicarbonsäure ausgefällt, jedoch reichen 20 Minuten Kochen der Lösung vor der Oxydation um sie zu zerstören. Über das Verhalten der CS selbst beim Kochen liegen etwas widersprechende Angaben in der Literatur vor (DIEUDONNÉ, 1903; OBERMAIER, 1904; ÖSTBERG, 1931; SJÖSTRÖM, 1937).

Trotz der vielen Modifikationen der Stahre'schen Methode, bei welchen versucht wurde die Oxydation bei möglichst günstigen Versuchsbedingungen auszuführen, ist die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion ziemlich hoch geblieben. Mengen unter  $\neq$  mg werden im allgemeinen nicht bestimmt. Die einzige Methode des Nachweises kleiner Pentabromaceton- und also auch CS-Mengen ist bisher von PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936) beschrieben worden. Diese Forscher beobachteten, dass das in Petroläther aufgenommene Pentabromaceton in Natriumsulfidlösung eine in Pyridin haltbare Farbe bildet, die zur kolorimetrischen Bestimmung geeignet ist.

Mit dieser Methode werden CS-Mengen von 0.1—1.0 mg nachgewiesen. Über die Ausführung der Bestimmung und Einzelheiten dieses Verfahrens soll im nächsten Kapitel berichtet werden.

Ausser in Gegenwart von Brom ist es auch versucht worden, die CS auf andere Art zu oxydieren und Bestimmungen darauf aufzubauen. So nahm DENIGÈS (1901) die Oxydation auch mit Kaliumpermanganat in stark saurer Lösung, aber in Gegenwart von Quecksilbersalzen vor. Aus dem hierbei entstehenden Komplex konnte die CS nach Wägung desselben errechnet werden. PRATT (1912) und WILLAMANN (1916) bestimmten auch das Komplexsalz gravimetrisch, aber BLEYER und SCHWAIBOLD (1925) verwendeten bei ihrer Mikromethode jodometrische Titrierung desselben. Jedoch die störende Wirkung vieler organischer Verbindungen schränkt auch den Gebrauch dieses Verfahrens ein. So erhält man bei der jodometrischen Titrierung zu grosse Werte durch den aus Milchsäure, Äpfelsäure u. a. gebildeten Acetaldehyd. KOGAN (1929) nahm die Oxydation in noch saurerer Lösung vor, wobei der Acetaldehyd zerstört werden soll. Auf ähnliche Art haben auch BARTELS (1933) und TÄUFEL und MAYR (1933) versucht die Specificität der Methode zu erhöhen. Als günstigste Acidität bei der Oxydation wurde pH 2 festgestellt. Die zuletzt genannten Forscher haben statt durch jodometrische Titration das bei der Oxydation gebildete Aceton direkt durch Destillation bestimmt.

MERK (1904) hat versucht die Acetondicarbonsäure nach der Oxydation der CS mit Nitroprussidnatrium zu bestimmen, wie andere Ketoverbindungen. JORISSEN (1919) bestimmt die bei der Oxydation abgespaltene Blausäure. BROEKSMITH (1904) setzt nach der Kaliumpermanganatbehandlung unter Erwärmen Ammoniak und Jodtinktur hinzu und bestimmt die Jodoformbildung. ROSENTHALER (1903) hat versucht Ferrichlorid zu verwenden wie bei der Untersuchung nahe verwandter Säuren. HÄUSSLER (1914) gibt an eine neue Farbreaktion entdeckt zu haben. Nach Hinzufügen von alkoholischer Vanillinlösung verdunstet er auf dem Wasserbad, wobei mit CS eine starke violette Farbe gebildet wird. Der Rückstand löst sich mit grünlicher Farbe in Wasser und schlägt um in rot nach Zusatz von Ammoniak. Zucker und Albumine sind vor der Reaktion zu entfernen. Erwähnt mag auch noch das Vorgehen von SPICA (1910) werden, der das beim Erhitzen von Calciumcitrat entstehende Kohlendioxyd mit dem Apparat von BEAU und DUNBARR (1911) bestimmt. AMBERG und MAYER (1922) ermitteln die Kohlensäure in dem Schliiff'schen Apparat mit 50 % Kaliumhydroxydlösung. — Keine dieser zuletzt angeführten Methoden hat aber grösseren Anklang gefunden.

Die Bestimmung sehr kleiner CS-Mengen, ebenso wie anderer organischer Säuren, ist KLEIN und WERNER (1925) gelungen, die noch mit 0.005 mg ein positives Ergebnis erhalten. Die Identifizierung der CS geschieht mikroskopisch als Silbersalzkristalle.

Schon oben wurde das von THUNBERG (1929) entdeckte spezifische dehydrierende Enzym der CS erwähnt. Die s. g. Thunberg-Methodik beruht auf der Fähigkeit von Methylenblau als Wasserstoffacceptor zu fungieren.

Bei der Oxydation der CS durch das Enzym in von Luft evakuierten Thunberg-Röhrchen wird das Methylenblau unter Verlust der Farbe zur Leukoverbindung reduciert. Je weniger CS in der Probe ist, desto langsamer verschwindet die Farbe. Erreicht die CS-Konzentration eine gewisse Höhe wächst die Entfärbungsgeschwindigkeit nicht mehr, sondern verbleibt gleicher Grösse. Durch Vergleich der unbekanntes Lösung mit einem Standart, dessen CS-Gehalt bekannt ist und dem ebenso viel Enzym- und Methylenblaulösung zugesetzt wird, kann die CS genau bestimmt werden. THUNBERG hat diese seine Methode eingehend in einer Publikation aus dem Jahre 1933 beschrieben.

Viele Forscher haben in zahlreichen Untersuchungen wiederholt die Spezifität dieser Reaktion geprüft oder mit anderen Worten untersucht, ob andere Verbindungen die Dehydrierung hemmen oder beschleunigen. So hat THUNBERG (1929) eine grosse Zahl biologischer Verbindungen untersucht und festgestellt, dass Äpfelsäure und Alkohol in 100-facher Konzentration die Farbe ebenso schnell zum Verschwinden bringen wie CS. — v. EULER und KLUSMANN (1933) konstatierten auch, dass die Ascorbinsäure ebenfalls Methylenblau reduzieren kann. GRÖNVALL (1937) und SJÖSTRÖM (1937) erklären aber, dass viel höhere Ascorbinsäuremengen notwendig sind als wie unter biologischen Bedingungen vorkommen, ehe es zu einer Störung des Reaktionsverlaufes kommt. Nach GRÖNVALL (1937) soll das Glutathion auf irgend eine Art und Weise die Reaktion hemmen, SJÖSTRÖM (1937) hat aber wenigstens unter normalen Bedingungen nie störende Mengen dieser Verbindung im Serum konstatieren können. v. EULER und KLUSMANN (1934) haben die Wirkung des Lichts in Gegenwart von Ascorbinsäure auf die Entfärbung von Methylenblau untersucht, und GRÖNVALL (1937) hat auch bemerkt, dass in dem CS-Dehydrasesystem die Farbe in grellem Sonnenlicht schneller verschwindet als sonst. Dies wird aber durch die bei jeder Bestimmung gleichzeitig angesetzte Standartprobe ausgeschaltet. Die Reaktion und der Mineralgehalt sind auch zu beachtende Faktoren. Kleine Unterschiede sollen aber nach SJÖSTRÖM (1937) wenigstens bei Serumbestimmungen nicht nennenswert stören.

Sehr bemerkenswert ist der Befund von MARTIUS und KNOOP (1937), dass es sich garnicht um die Dehydrase der CS sondern der iso-CS handelt, sodass also vor allem diese Säure und nur neben ihr die CS bestimmt wird.

Viel Mühe bei der Thunbergmethodik hat die Berechnung verursacht. Die Entfärbung der Eiweiss-haltigen zu untersuchenden Lösungen und des Eiweiss-freien Standarts geht nämlich nicht immer mit der gleichen, proportionalen Geschwindigkeit vorsich bei verschiedenen CS-Konzentrationen. U. a. THUNBERG (1929), ÖSTBERG (1931), SJÖSTRÖM (1937) und GRÖNVALL (1937) haben jeder eine etwas andere Berechnungsart angegeben, deren Erklärung in diesem Zusammenhang nicht notwendig ist. Da die auf verschiedene Art berechneten Ergebnisse nicht besonders grosse Unterschiede aufweisen, habe ich der Einfachheit halber bei meinen Kontrollbestimmungen die ursprüngliche Berechnungsart von THUNBERG verwendet.



Viele Forscher haben Vergleichsbestimmungen zwischen den verschiedenen Methoden ausgeführt. So benutzten Mc CLURE und SAUER (1921) bei ihren Untersuchungen die Methode von DENIGÈS und andererseits die Pentabromaceton-Modifikation von STAHRÉ. Die Resultate erwiesen sich als ziemlich schlecht. ÖSTBERG (1931) vergleicht die zuletzt erwähnte Methode mit der Thunberg'schen, wobei er in wässrigen Lösungen und im Harn mit der Pentabromacetonmodifikation kleinere Werte erhielt. Mit der von ihm berechneten Korrektur (5.45 mg) erhält er jedoch einigermassen übereinstimmende Werte. NORDBÖ und SCHERSTÉN (1931) verglichen mit der Thunberg-Methode die Pentabromaceton-Modifikation von BLEYER und SCHWAIBOLD (1925) und erhielten ebenfalls kleinere Werte mit der letzteren. Ebenso musste SCHERSTÉN (1937) bei Vergleich der biologischen Methode mit der Acetonmethode von TÄUFEL und MAYR (1933) eine entsprechende Korrektur (3.78 mg) vornehmen. Schliesslich haben KRUSIUS und VESA (1939) sowie KRUSIUS (1940) einige Vergleichsbestimmungen der Thunberg'schen Methode mit dem kolorimetrischen Verfahren von PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936) im Serum vorgenommen und hierbei recht gut übereinstimmende Werte gefunden.

## 2. Die kolorimetrische Methode von PUCHER, SHERMAN und VICKERY.

In den vorgenommenen Versuchen wurde die CS-Bestimmung nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936) durch Oxydation derselben in saurer Lösung zu Pentabromaceton und kolorimetrische Bestimmung der in Pyridin haltbaren Farbe mit Natriumsulfid ausgeführt. Diese Methode wurde wegen ihres verhältnismässig leichten und kurzen Arbeitsganges gewählt. Auch hatte sich das Verfahren bei früheren Untersuchungen (PUCHER, SHERMAN und VICKERY, 1936; SIMOLA und ALAPEUSO, 1938; KREBS, SALVIN und JOHNSON, 1938) als besonders geeignet für Bestimmungen in Gewebsextrakten erwiesen, in denen der CS-Gehalt bedingt durch die vorhandenen Enzyme grossen Schwankungen unterliegt. Um die Umsetzungsvorgänge schnell zu unterbrechen ist eine Behandlung mit stark wirkenden Stoffen unbedingt notwendig. Aus diesem Grunde eignet sich die Enzym-Methode nicht. Ferner wird durch diese chemische Methode tatsächlich die CS und nicht die iso-CS wie bei dem Thunberg-Verfahren bestimmt.

### a. Die Ausführung der CS-Bestimmung.

Abgesehen von einigen geringfügigen Veränderungen wurden die Bestimmungen nach der von PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936) beschriebenen Methode ausgeführt:

Von der zu untersuchenden Lösung, aus der das Eiweiss entfernt ist, wird ein aliquoter Teil, der nicht mehr als 0.1—1.0 mg CS enthält, in ein ca. 150 cm<sup>3</sup> fassendes Dekantierglas pipetiert. Es wird mit Wasser auf ca. 50 cm<sup>3</sup> verdünnt, wonach 3 cm<sup>3</sup> der 50 % Schwefelsäure hinzugegeben werden um eine stark saure Reaktion zu erreichen. Hiernach wird 10

Minuten über einer Bunsenflamme gekocht. Vorteilhaft ist der Zusatz einiger Glasperlen um gleichmässiges Kochen zu erzielen. Anschliessend wird die Lösung auf Eis zu Zimmertemperatur abgekühlt.

Nach Zusatz eines Überschusses von Bromwasser (gewöhnlich 3—4 cm<sup>3</sup>) muss die Lösung wieder 10 Minuten stehen. Wenn während dieser Zeit eine Trübung der Fällung entsteht wartet man noch weitere 20 Minuten und gibt soviel Bromwasser hinzu, dass ein sicherer Überschuss vorhanden ist. Hiernach wird zentrifugiert; hat sich nach den ersten 10 Minuten keine Trübung gebildet braucht man natürlich nicht derart zu verfahren.

Anschliessend wird die Lösung quantitativ in einen Scheidetrichter von ca. 125 cm<sup>3</sup> gebracht und zur Oxydation der CS zu Pentabromaceton mit 2 cm<sup>3</sup> Kaliumbromid- und 10 cm<sup>3</sup> Kaliumpermanganatlösung versetzt. Nach 10 Minuten langem Stehen, wobei die rote Permanganatfarbe nicht verschwinden darf, wird mit Ferrosulfat oder Wasserstoffsperoxyd entfärbt.

Das entstandene Pentabromaceton wird nun in Petroläther aufgenommen durch zweimaliges Schütteln mit 25 cm<sup>3</sup>. Die erste Petrolätherfraktion wird einmal mit 5—10 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen und dann die kombinierten Petrolätherfraktionen noch viermal mit derselben Wassermenge. Nach vollzogener Waschung der Petrolätherschicht, die völlig frei von Eisen sein muss, wird nach einander mit 3, 2, 1 cm<sup>3</sup> Natriumsulfidlösung geschüttelt und jede Sulfidfraktion quantitativ in eine 10 cm<sup>3</sup> Massflasche gebracht, in der bereits 3.5 cm<sup>3</sup> Pyridin ist. Anschliessend wird die Flasche bis zur Marke mit 50 % Pyridin aufgefüllt.

Die entstandene gelbe bis gelbbraune Farblösung wird mit dem Stufenphotometer innerhalb von 30 Minuten bestimmt. Filter S-43. — Der gefundene Extinctionskoeffizient wird verglichen mit durch Analysierung bekannter CS-Lösungen erhaltenen Werten, indem man aus der graphisch dargestellten Extinctionskurve direkt den CS-Wert der Lösung abliest.

#### *Die notwendigen Reagentien:*

1. 50 vol. % Schwefelsäure (wird hergestellt durch Verdünnung konz. Säure mit gleichen Teilen Wasser).
2. CS-Standard-Lösung zur Bestimmung der Extinctionskurve (1 cm<sup>3</sup> der Lösung entspricht 10 mg CS. Bei dem Anfertigen der Lösung in ca. 1-n Schwefelsäure wird das Kristallwasser der CS berücksichtigt).
3. Bromwasser, gesättigte Lösung.
4. 1-n Kaliumbromidlösung (11.99 g KBr ad 100 aqua dest.).
5. 1.5-m Kaliumpermanganatlösung (47.4 g KMnO<sub>4</sub> ad 1000 aq. dest.).
6. 4 % Natriumsulfidlösung. Neu herzustellen jeden 2. oder spätestens jeden 3. Tag. Vor dem Gebrauch zu filtrieren, falls die Lösung nicht klar ist.
7. Petroläther (Kochpunkt 35—50°).

8. Pyridin (Kochpunkt 112—117°).
9. 50 % Pyridinlösung (Verdünnung mit gleichen Teilen Wasser).
10. 3 % Wasserstoffsuperoxydlösung.
11. 20 % Ferrosulfatlösung (20 g Krist. Salz, 1 cm<sup>3</sup> konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ad 100 Wasser).

Das Kochen wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu der Originalmethode in Erlenmeyerflaschen von 150 cm<sup>3</sup> vorgenommen, da hier das Sieden viel gleichmässiger ist. Dies ist besonders bei Bestimmungen aus Wasserlösungen zu beachten.

Die Erfinder der Methode empfehlen zur Entfernung der Kaliumpermanganatfarbe Ferrosulfat. Hierbei ist ein sehr sorgfältiges Waschen zur Entfernung des Eisens unbedingt erforderlich. Benutzt man dagegen Wasserstoffsuperoxyd zur Entfärbung kann man ohne weiteres zwei Waschungen fortlassen, sich also mit der Hälfte begnügen. Dies umso mehr, als selbst viermalige Waschung sich oft nach der Entfärbung mit Ferrosulfat als nicht genügend erwies, da bei der Aufnahme in Natriumsulfid oft eine grünliche, durch Spuren von Eisen bedingte Farbe entstand, die bei der Photometrierung störte. Die Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd schaltet diese Fehlermöglichkeit aus und verkürzt den Arbeitsgang.

Es zeigte sich, dass das Pentabromaceton sehr leicht von Petroläther aufgenommen wird. Schon nach der ersten Extraktion bleiben nur noch Spuren desselben, selbst bei grossen Mengen, in der Wasserschicht zurück und bei der zweiten Extraktion der Lösung mit — im Gegensatz zu der ursprünglichen Bestimmung — nur der Hälfte der vorgeschriebenen Petroläthermenge, also 10 cm<sup>3</sup>, wird das gesamte Pentabromaceton quantitativ erfasst.

Ein Nachteil dieser Methode, ebensowie der von THUNBERG ist die verhältnismässig geringe CS-Quantität, die in der zu analysierenden Lösung vorhanden sein darf. Kleine Mengen werden zwar noch genau bestimmt, aber die obere Grenze liegt sehr niedrig. Durch Vornahme orientierender Bestimmungen kann man natürlich feststellen, zu welcher Grössenklasse der CS-Gehalt der fraglichen Lösung gehört, aber die Arbeit wird hierdurch verdoppelt.

Durch Verdünnung der in Pyridin aufgenommenen Natriumsulfidschicht in einer grösseren Massflasche mit 50 % Pyridin und durch Photometrierung dieser Lösung kann man auch grössere Mengen bestimmen. Jedoch erwiesen sich die Ergebnisse nach Multiplikation des abgelesenen Wertes mit dem Verdünnungskoeffizient als ziemlich ungenau. Zu besseren Resultaten gelangt man, wenn man für jede Verdünnung eine eigene Standart-Extinctionskurve anfertigt (vgl. Abbildung Nr. 1).

Die graphischen Kurven wurden erhalten durch CS-Bestimmungen mit einer Standartlösung, wie aus der Tabelle Nr. 1 hervorgeht.

Tabelle Nr. 1.

CS-Standard-Extinctionswerte bei Verwendung verschiedener Pyridinverdünnungen.

Zugesetzte CS in mg	Extinctionskoeffizient <sup>1</sup>		
	Verdünnung 1: 10	Verdünnung 2: 10	Verdünnung 3: 10
1.0	0.090	0.180	0.265
1.5	0.150 <sup>1</sup>	0.320	0.465
2.0	0.220	0.440	0.610
2.5	0.290 <sup>1</sup>	0.580	0.825
3.0	0.350	0.705	0.950
4.0	0.475	0.950	—

<sup>1</sup> Die Extinctionskoeffizienten sind der Mittelwert von vier Bestimmungen.

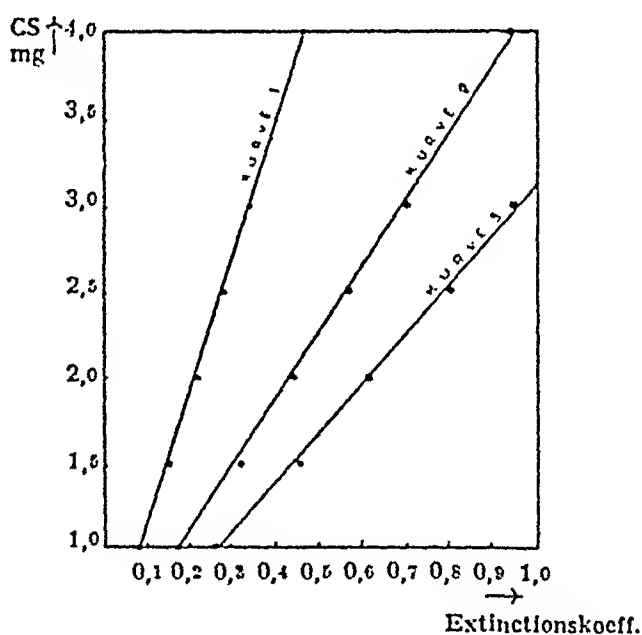


Abb. Nr. 1.

CS-Bestimmung in verschiedenen Verdünnungen.

Kurve 1: Verdünnung 1: 10.

Kurve 2:        "      2: 10.

Kurve 3:        "      3: 10.

### b. Spezifität der CS-Bestimmung.

Bei Prüfung der Spezifität der Reaktion konstatierten PUCHER, SHERMAN und VICKERY (1936), dass von einer grossen Zahl organischer Verbindungen nur die  $\beta$ -Oxybuttersäure und der Äthylester der Acetondicarbonsäure in Mengen von 100—200 mg eine Farbe geben, die 0.1—0.5 mg, manchmal sogar 0.8 mg CS entspricht.

Die übrigen von diesen Forschern geprüften, sich negativ verhaltenden Verbindungen waren: Aceton, Glycogen, Hämatinsäure, Kreatin und Kreatinin, Cholestearin, Harnsäure, Hippursäure, Amytol, Harnstoff, Taurin, Toluol, Allantoin, Oxalsäure, Tartronsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Äpfelsäure und Fumarsäure.

Was erstens die Acetondicarbonsäure anbetrifft, zeigte schon COMMETIANI (1931) im Zusammenhang mit seiner Methode, dass die Säure bei 20 Minuten langem Kochen der Lösung völlig zerstört wird. Bei seiner Methode, wird wie schon erwähnt, das durch Oxydation der CS gebildete Pentabromaceton gravimetrisch bestimmt. Nach vielen Forschern soll beim Kochen auch ein Teil der CS verloren gehen (DIEUDONNÉ, 1903; OBERMEYER, 1904; ÖSTBERG, 1931; SJÖSTRÖM, 1937), während wiederum andere wie COMMETIANI (1931) und KREBS und JOHNSON (1937) das Gegenteil behaupten. Die zuletzt erwähnten Forscher, deren Befunde mit meinen diesbezüglichen Versuchen übereinstimmen, halten die Lösung sogar eine Stunde auf dem Wasserbade. Durch Kochen der bekannten CS-Lösungen beim Aufstellen der Standart-Extinctionskurven genau wie die Analysen selbst, wird aber dieser Faktor jedenfalls ausgeschlossen.

Die Wirkung der  $\beta$ -Oxybuttersäure auf den Verlauf der Reaktion nahm ab, wenn die Lösung längere Zeit vor der Bestimmung stehen gelassen wurde. Tabelle Nr. 2 zeigt die CS-Werte, die erhalten wurden mit 180 mg (0.02-m Lösung) der Säure bei sofortiger Bestimmung und bei Bestimmung nach 24 Stunden stehen.<sup>1</sup>

Tabelle Nr. 2.

Die Wirkung der  $\beta$ -Oxybuttersäure (180 mg) auf die CS-Bestimmung. — Entsprechende CS in mg.

Sofort	Nach 24 Stunden
0.6 mg .....	0 mg
0.60 „ .....	0 „
0.65 „ .....	0.10 „
0.75 „ .....	0.30 „
0.75 „ .....	0.20 „
0.80 „ .....	0.35 „
0.80 „ .....	0.10 „
0.90 „ .....	0.25 „
1.00 „ .....	0.35 „
1.00 „ .....	0.25 „

<sup>1</sup> In dieser Arbeit ist sowohl  $\beta$ -Oxybuttersäure der Firma Dr. THEODOR SCHUCHARDT, G.m.b.H., Görlitz als auch von *British Drug Houses Ltd.*, London verwendet worden.

Wie aus der Tabelle zu sehen ist, verschwindet die  $\beta$ -Oxybuttersäure nicht immer im gleichen Verhältnis und gibt auch nicht immer den entsprechenden CS-Wert. Lässt man die Lösung über Nacht stehen, sind jedoch die Unterschiede so gering, dass eingermassen relative Bestimmungen in Frage kommen.

Ausser den oben angeführten Verbindungen habe ich noch eine Reihe anderer Säuren, die als eventuelle CS-Bildner beachtet werden müssen, auf ihr Verhalten bei der kolorimetrischen Bestimmung untersucht. Bei diesen Bestimmungen wurden die Säuren in 0.02-m Lösung (50 cm<sup>3</sup>) verwendet, genau wie bei den späteren synthetischen Versuchen.

Tabelle Nr. 3.

Die Wirkung verschiedener Substrate (0.02-m) auf die CS-Bestimmung.

Die untersuchte Verbindung	CS in mg
Acetaldehyd .....	0
Essigsäure .....	0
Mesoxalsäure .....	0
Brenztraubensäure .....	+
Brenztraubensäurealdol <sup>1</sup> ....	2.95
$\beta$ -Glycerinphosphorsäure ....	0
Propionsäure.....	0
n-Buttersäure .....	0.20
iso-Buttersäure .....	0.20
Crotonsäure .....	0.40
Weinsäure .....	0
Bernsteinsäure .....	0
Fumarsäure .....	0
l-Äpfelsäure .....	0
Oxalelessigsäure .....	0.70—0.15
Glutarsäure.....	0
$\alpha$ -Ketoglutarsäure <sup>2</sup> .....	+
Adipinsäure .....	0
Cltraconsäure .....	0
Aconitsäure .....	0
Glycolsäure .....	0
Glucose .....	0
Tricarballoylsäure .....	0
Itaconsäure.....	8.20
Glutaminsäure .....	0
Asparaginsäure .....	0

<sup>1</sup> In diesem Laboratorium aus Brenztraubensäure hergestellt (vgl. KNUSIUS, 1940).

<sup>2</sup> Mir von Prof. SIMOLA zur Verfügung gestellt, Reinheit etwa 80 %.

Wie man sieht gibt besonders die Itaconsäure eine starke Farbe. Bei wiederholten Bestimmungen blieb der Wert immer der gleiche und auch Schwankungen nach der Art der  $\beta$ -Oxybuttersäure konnten nicht beobachtet werden. Der durch diese Säure möglicherweise hervorgerufene CS-Wert wird aber bei den Syntheseversuchen durch die Parallelproben ausgeschaltet. Dasselbe gilt auch für die anderen störenden Verbindungen, also Brenztraubensäurealdol, Crotonsäure, Buttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutar-säure und Brenztraubensäure. Was speziell die Itaconsäure anbetrifft, ist sie bisher nie im Tierkörper nachgewiesen worden.

Ein deutlicheres Bild über die störenden Substanzen gibt die Tabelle Nr. 4, in welcher Versuche angeführt sind, bei welchen zu 0.5 mg CS steigende Mengen der zu prüfenden Säuren zugesetzt wurden.

Tabelle Nr. 4.

*Die Wirkung zunehmender Mengen verschiedener Substrate auf die CS-Bestimmung.*

Geprüfte Säure	Zu 0.5 mg CS hinzugefügte Säuremenge <sup>1</sup> Erhaltene CS-Werte in mg						
	0	0.5	1.0	5.0	10.0	50.0	100.0
Brenztraubensäurealdol	0.45	0.46	0.47	0.56	0.62	0.79	1.02
Brenztraubensäure . . . .	0.45	0.43	0.45	0.46	0.46	0.48	0.48
n-Buttersäure . . . . .	0.48	0.48	0.46	0.50	0.50	0.54	0.54
$\beta$ -Oxybuttersäure . . . .	0.46	0.47	0.47	0.50	0.50	0.50	0.60
Crotonsäure . . . . .	0.47	0.49	0.52	0.52	0.54	0.60	0.72
$\alpha$ -Ketoglutar-säure . . . .	0.48	0.45	0.47	0.47	0.49	0.49	0.49
Itaconsäure . . . . .	0.48	0.50	0.52	0.60	0.76	2.05	3.50
Acetondicarbon-säure ..	0.50	0.51	0.50	0.50	0.51	0.52	0.52

<sup>1</sup> Krist. CS gewogen, ohne Berücksichtigung des Kristallwassers.

Die wichtigsten Verbindungen bei den synthetischen Versuchen, die Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketoglutar-säure erhöhen in Gegenwart von CS selbst in 100-facher Menge die CS-Werte nicht. Die anderen Säuren haben erst einen Einfluss auf die Reaktion in solchen Konzentrationen, wie sie unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommen.

Bei Untersuchung der CS-Bildung mussten aber diese Verbindungen gerade in den genannten Konzentrationen verwendet werden, daher musste ihre Einwirkung bei der CS-Bestimmung auf andere Art eliminiert werden. Neben der gewöhnlichen Gewebeprobe, in der CS entsteht, wird eine Parallelprobe vorgenommen, bei der die entsprechende Säuremenge direkt zu der ausgefallten Gewebesuspension gegeben wird, so dass keine physiologischen Bildungs- oder Spaltungsprozesse mehr stattfinden können. Durch Vergleichen dieser beiden Bestimmungen erhält man die Veränderung im CS-Gehalt. — Was die zugesetzte Substanz, die geprüft werden sollte, anbetrifft, nimmt ihr Gehalt in der Probe während des Versuchs aller Wahr-

scheinlichkeit nach ab. Es scheint jedenfalls unmöglich, dass ihre Konzentration noch zunimmt, besonders da sie schon in »überphysiologischen« Mengen zugesetzt wurde.

Was die Oxalessigsäure speziell anbetrifft, haben KREBS und JOHNSON (1937) vorgeschlagen vor der CS-Bestimmung nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY eine Stunde auf dem Wasserbade zu kochen um ihre Wirkung auszuschalten. BREUSCH (1937) behauptet wiederum bei Bestimmung der CS nach COMMETIANI, dass die Oxalessigsäure in verdünnten Lösungen die Fähigkeit verlöre die Pentabromacetonreaktion zu stören, in starken Lösungen soll jedoch der die Reaktion gebende Komplex erhalten bleiben. BREUSCH nimmt an, dass hier eine Kondensation zweier Moleküle Oxallessigsäure stattfindet oder dass die von MARTIUS und KNOOP (1936) gefundene rein chemische CS-Synthese aus Oxalessigsäure und Brenztraubensäure zustande kommt. Die hierzu notwendige Brenztraubensäure würde durch Kohlensäureabspaltung aus Oxalessigsäure gebildet. Unneutralisiert, in saurer Lösung, soll die Oxalessigsäure dagegen nach BREUSCH gar keine CS-Reaktion geben. Die erwähnte Kondensation träte erst bei der Neutralisierung der Lösung ein, welche er ausführt, indem er 40 % Natriumhydroxyd zu 5—10 cm<sup>3</sup> der Lösung gibt, die 100—150 mg Oxalessigsäure enthalten. Hierbei findet er mit der Pentabromacetonreaktion Werte, die 1—9 mg CS entsprechen. COMMETIANI (1931) selbst konstatierte jedoch nicht, wie schon früher erwähnt wurde, dass die Oxalessigsäure störend bei den Bestimmungen wirkt. In diesem Zusammenhang kann man nicht umhin die starken Konzentrationen zu beachten, die BREUSCH bei der Neutralisierung verwendet, dazu noch mit 40 % Natriumhydroxyd.

Mir standen zwei verschiedenen Präparate Oxalessigsäure zur Verfügung:

I. Oxalessigsäure. Enol-form. »Bayer«.

II. Nach WOHL und ÖSTERLIN (1901) im Chemischen Laboratorium der Universität Helsinki dargestellte und nach CLAUSNER (1907) gereinigte Oxalessigsäure, ebenfalls Enol-form. Schmelzpunkt 150—153°.

Das erste Präparat war gelblich und stark hygroskopisch. Das zweite war dagegen hellgrau und sog die Luftfeuchtigkeit nicht so schnell an. Das Präparat von »Bayer« war schon feucht beim Öffnen der Flaschen, so dass man mit Recht annehmen kann, dass es schon teilweise verändert war. Mit diesen Präparaten wurde Versuche vorgenommen um nachzuweisen, dass die Oxalessigsäure in den benutzten Konzentrationen und bei den vorliegenden Bedingungen nicht störend bei der CS-Bestimmung wirkt. Mit beiden Präparaten habe ich folgende Versuche angestellt:

1. 50 mg Oxalessigsäure abgewogen und in 50 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. CS-Bestimmung unmittelbar anschliessend.
2. Dieselbe Säuremenge in Wasser gelöst und genau mit 1-n Natriumhydroxyd neutralisiert.
3. Wie die vorhergehende Probe, nur wird vor der Bestimmung eine Stunde auf dem Wasserbade gekocht.



4. Dieselbe Säuremenge mit überschüssigen Hydroxyd neutralisiert.
5. Wie die vorhergehende Probe, aber 1-stündiges Kochen auf dem Wasserbade vor der CS-Bestimmung.
6. Die Säure sorgfältigst in eine kleine Wassermenge (10 cm<sup>3</sup>) gelöst und mit 1 % Natriumbicarbonat-Lösung (der in den späteren Versuchen am meisten benutzte Puffer) neutralisiert und auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt.
7. Wie 6, aber anschliessen Wasserbadbehandlung.

Tabelle Nr. 5.

*Die Wirkung der Oxalessigsäure auf die CS-Bestimmung.*

Versuch Nr.	Präparat I	Präparat II
1	0.70 mg CS	0 mg CS
2	1.25 „	0.15 „
3	0.73 „	+ „
4	1.50 „	0.18 „
5	0.70 „	+ „
6	0.75 „	0.10
7	0.70 „	0 „

Wahrscheinlich liegt im Präparat I bereits irgendein, sagen wir Komplex vor, der die CS-Reaktion gibt. Dies geht schon aus dem Versuch 1 mit der Wasserlösung hervor. Der Komplex ist so stabil, dass er nicht einmal durch das von KREBS vorgeschlagene 1-stündige Kochen auf dem Wasserbade ganz zerstört wird. Das Vorkommen einer solchen, die Pentabromacetonreaktion gebenden Verbindung in dem Bayer'schen Präparat, welches ursprünglich höchst wahrscheinlich nur Oxalessigsäure enthielt, ist schon an sich ein Beweis für die Neigung der Oxalessigsäure sich rein chemisch zu CS oder einer ihr nahestehenden Verbindung zu kondensieren. Dies kann möglicherweise auch wie bei der Synthese von KNOOP und MARTIUS über Brenztraubensäure als Zwischenform geschehen. — Bemerkenswert ist jedoch, dass bei Neutralisierung der Lösung, besonders wenn dies mit grossem Alkali-Überschuss geschieht, ihr CS-Wert zunimmt. Der Wertunterschied zwischen der mit überschüssiger Lauge und der bis pH 7 neutralisierten Lösung verschwindet aber beim Kochen auf dem Wasserbade. Dies deutet daraufhin, dass bei der Neutralisierung wenigstens nicht direkt dieselbe Verbindung d. h. CS gebildet wird, da dass Verschwinden dann im selben Verhältnis wie zwischen Probe 2 und 1 vor-sichgehen müsste.

Mit dem Präparat II, welches in reiner Wasserlösung gar keine CS-Werte gibt, erhält man zwar bei Neutralisierung unter denselben Versuchsbedingungen, die durch den Komplex bedingte Zunahme der Werte, aber in viel geringerem Grade. Dieser die Reaktion gebende

Komplex des Präparates II wird bei dem Kochen auf dem Wasserbade beinahe gänzlich zerstört. Man muss annehmen, dass in dem Präparat I schon eine Substanz vorhanden ist, welche bei Behandlung mit Base leichter zu einer CS-artigen Verbindung umgewandelt wird als wie die reine Oxalessigsäure.

Die oben beschriebenen Versuche zeigen, dass bei den benutzten Versuchsbedingungen unveränderte Oxalessigsäure die Pentabromacetone-reaktion nicht stört, aber dass andererseits die Oxalessigsäure bei der Neutralisierung die Neigung hat sich zu einem störenden Komplex zu verwandeln, welcher erst durch 1-stündiges Kochen auf dem Wasserbade zerstört wird. In dieser Zeit dürfte höchst wahrscheinlich auch die Oxalessigsäure selbst verschwinden.

Bei den mit dem Bayer'schen Präparat vorgenommenen Versuchen wurde der störende Faktor durch Ausführung einer Parallelprobe eliminiert, in welcher die Enzyme vorher zerstört wurden. Durch Vergleichen mit dieser erhält man die Veränderung des CS-Gehalts in der eigentlichen Probe. Sicherheitshalber wurde dieses Verfahren auch bei Versuchen mit dem zweiten Präparat befolgt.

### c. Bestimmungen mit Gewebsextrakten.

Wie schon im Vorhergehenden hervorgehoben wurde, geschah die CS-Bestimmung im mit Trichloressigsäure enteiweissten Filtrat. Die Tabelle Nr. 6, in welcher Parallelbestimmungen in mehreren verschiedenen Geweben, nämlich Nieren, Gehirn, Testis, Skelett- und Herzmuskel angeführt sind, zeigt, dass die Unterschiede nur sehr gering sind, obgleich in einigen Fällen die Bestimmungen mit sehr kleinen aliquoten Filtratmengen (Herzmuskel) vorgenommen wurden. Von den 21 ausgeführten Bestimmungen beträgt die grösste Differenz der Parallelbestimmungen 2 %, während der Fehler von 12 unter 1 % liegt. Der durchschnittliche Fehler (arithmetischer Mittelwert) betrug 0.77 %. Die Genauigkeit stimmt mit den in Wasserlösungen erhaltenen Ergebnissen überein. — Bei Entfernung des Eiweiss durch Kochen wurden die Werte viel ungenauer, indem der mittlere Fehler bis zu 6 % anstieg und das in der Lösung verbliebene Eiweiss die Photometrierung störte.

Wie genau wird nun der CS-Gehalt des Gewebes in einem aliquoten Teil bestimmt? — Bei Untersuchungen über die Bildung und den Abbau der CS ist es nicht unbedingt notwendig die absoluten CS-Werte zu erfahren, da die Methode immer dieselbe ist und ein kleiner eventueller Fehler in allen Versuchen der gleiche ist und folglich ausgeschaltet wird. — Was wiederum die direkten CS-Bestimmungen in Geweben anbetrifft, wurde schon erwähnt, dass die Gewebe, die viel CS enthalten, mit so grosser Flüssigkeitsmenge behandelt werden können, dass alle CS aus der Fällung weggespült wird, ohne dass die Quantität so gross wird, dass keine Bestimmung mehr vorgenommen werden kann.

In den meisten Geweben ist jedoch nur so wenig Säure vorhanden, dass

Tabelle Nr 6.

*Die Genauigkeit der CS-Bestimmung in Gewebsextrakten.*

Gewebe	Parallelbestimmungen CS in mg		Unterschied in mg	Durchschnitt- licher Unterschied in %
	1	2		
Nieren .....	2.56	2.50	0.06	1.19
„ .....	5.36	5.36	0	0
„ .....	10.00	10.16	0.16	0.76
„ .....	15.20	15.30	0.10	0.33
„ .....	24.80	25.40	0.60	1.18
Herzmuskel ....	1.92	2.00	0.08	2.00
„ ....	4.32	4.44	0.12	1.35
„ ....	8.56	8.56	0	0
„ ....	12.72	12.72	0	0
„ ....	21.60	22.00	0.40	0.91
Skelettmuskel ..	2.90	2.96	0.06	1.02
„ ..	5.42	5.44	0.02	0.18
„ ..	6.00	6.15	0.15	1.15
Gehirn .....	1.92	1.96	0.04	1.02
„ .....	4.68	4.79	0.11	1.33
„ .....	0.90	0.91	0.01	0.55
„ .....	0.60	0.62	0.02	1.64
„ .....	1.50	1.50	0	0
Testis .....	6.36	6.36	0	0
„ .....	8.00	8.15	0.15	0.93
„ .....	8.08	8.19	0.11	0.65
			Durchschn. Fehler $\pm 0.77\%$	
			Grösster „ $\pm 2.00$ „	

Tabelle Nr. 7.

*CS-Bestimmung in Nierengewebe bei Berücksichtigung der Gewebsmasse.*

CS des Gewebes + zugesetzte CS	CS ohne Korrektur		CS nach Korrektur	
	mg	in % des tatsächlichen Gehalts	mg	in % des tatsächlichen Gehalts
1.18	0.98	83.05	1.17	99.24
2.68	2.19	81.72	2.70	100.74
5.18	4.23	81.63	5.02	97.95
7.68	6.36	82.81	7.55	98.25
12.68	10.80	83.58	12.74	100.48

eine genügende Waschung der Fällung nicht in Frage kommt und man sich daher mit einem aliquoten Teil des Filtrates begnügen muss. Tabelle Nr. 7, deren Werte durch Bestimmungen mit Nierengewebe erhalten wurden, zeigt, dass man, wenn man den Flüssigkeitsgehalt der Gewebe zu 75 % ansetzt und den dementsprechenden CS-Wert als Resultat berechnet, zu ziemlich richtigen Werten gelangt. Diese Versuche wurden ausgeführt, indem zu dem Gewebe bestimmte Mengen CS hinzugefügt wurden. Zur Extraktion wurde 40 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit verwendet (20 cm<sup>3</sup> Wasser und 20 cm<sup>3</sup> 20 % Trichloressigsäure; Gewebe 10 g). Bei der Korrektur berechnet man also 7.5 cm<sup>3</sup> oder der aliquote Teil wird auf 47.5 cm<sup>3</sup> Gesamtvolumen berechnet.

In den vorgenommenen Versuchen sind alle Werte annähernd 100 %. Die grösste Differenz beträgt 2.05 %, was bei Bestimmung so kleiner CS-Mengen, wie sie im Gewebe selbst vorkommen, keine nennenswerte Rolle spielt. Die Grössenordnung der Werte kommt jedenfalls deutlich zum Vorschein.

Schon früher stellten wir fest, dass einige organische Säuren in grossen Mengen störend auf den Reaktionsverlauf wirken. Zur Ausschaltung dieses Fehlers wurden, wie erwähnt, immer Parallelbestimmungen vorgenommen mit Gewebe, in welchem die Enzyme vorher mit Trichloressigsäure zerstört worden waren.

### III. Die Ergebnisse.

#### A. Die Citronensäurebildung in Gewebesuspensionen.

##### 1. Die Wirkung der äusseren Bedingungen auf die Citronensäurebildung.

Bei früher vorgenommenen Versuchen (SIMOLA, 1938; SIMOLA und ALAPEUSO, 1938; HALLMAN und SIMOLA, 1938; HALLMAN, 1938<sup>1</sup>) wurde konstatiert, dass CS in den Geweben vom Rind, besonders nach Zusatz von Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, l-Äpfelsäure, Oxalessigsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Buttersäure zu den Suspensionen gebildet wird. Es wurde kurz angegeben, dass die Bildung am besten unter aeroben Bedingungen stattfindet und dass eine Bebrütungszeit von 30 Minuten am günstigsten sei. Ferner waren diese Versuche in alkalischen Bicarbonatpufferlösungen ausgeführt worden, genauere Einzelheiten über die Versuchsbedingungen wurden aber nicht angegeben.

Die erste Aufgabe im Zusammenhang mit dieser Arbeit war es zu untersuchen, bei welchen Versuchsbedingungen die CS-Bildung aus den oben angeführten Säuren am grössten ist und ob dieser Vorgang durch irgendwelche anderen Faktoren beeinflusst wird, vor allem welche Wirkung die verschiedenen Gewebsgifte haben.

##### a. *Bebrütungszeit.*

In früheren Versuchen hatte sich das Nierengewebe als bester CS-Bildner erwiesen. Die Tabelle Nr. 8 zeigt, dass die CS-Bildung in Nierengewebe-Suspensionen (1 % Bicarbonatpuffer) schon beim Einleiten von Sauerstoff recht stark ist. Diese spontane Vermehrung ohne Zusatz irgendeines Substrates ist sehr beachtenswert. Beim weiteren zeitlichen Verfolgen der CS-Bildung bemerken wir nach Zusatz der einzelnen Säuren eine stetige Zunahme derselben, aber schon bald, nach 15 Minuten Bebrütungszeit tritt eine Änderung ein. In den folgenden Zeiteinheiten tritt statt Zunahme der Säure in den Gewebesuspensionen eine Abnahme ein, die anfangs sogar verhältnismässig gross ist. Auch die spontan entstandene CS

<sup>1</sup> Im Zusammenhang mit dieser Arbeit.

Tabelle Nr. 8

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe. CS in mg.*

Substrat (m/50)	Im Gewebe praeformierte CS	CS nach 15 Min. O <sub>2</sub> -Einlei- tung	CS nach Bebrütung in Min.					
			15	30	60	90	120	240
Brenztraubensäure	0.82	3.12	3.44	3.28	2.56	—	1.06	0.85
$\alpha$ -Ketoglutarsäure	0.46	3.52	8.60	7.90	7.60	—	4.42	2.05
Bernsteinsäure . . . .	0.33	1.82	1.93	1.71	1.09	0.96	0.75	0.40
Fumarsäure . . . . .	0.43	2.32	3.80	3.92	2.16	1.60	1.31	0.90
l-Äpfelsäure . . . . .	0.49	2.96	3.20	2.08	1.95	1.45	1.12	0.80
Buttersäure . . . . .	0.30	1.77	2.00	1.70	1.30	—	0.62	0.18
$\beta$ -Oxybuttersäure..	0.44	3.90	6.22	4.14	2.70	—	1.42	0.84
Ohne Substrat . . . .	0.40	1.40	1.35	0.95	0.65	—	0.25	0.15

wird gleichzeitig abgebaut. Zuletzt wird der ursprüngliche Ausgangswert des Gewebes unterschritten. Nach 2-stündiger Bebrütung, welche bei den ersten systematischen Versuchen verwendet wurde (SIMOLA und HALLMAN, 1938), sind die Unterschiede der Versuche mit verschiedenen Säuren verglichen mit den ursprünglichen Werten minimal und nach den nächsten 2 Stunden kann man nur noch von einer Erhöhung des CS-Gehalts durch  $\alpha$ -Ketoglutarsäure sprechen.

Es besteht kein Zweifel darüber, dass bei diesen synthetischen Versuchen neben der CS-Bildung auch ein Abbau derselben stattfindet, wodurch teilweise die Versuchsergebnisse verdeckt werden. Ganz unabhängig davon, auf welchem Wege die CS-Bildung vorsieht, scheint ihr reichliches Vorkommen in den Suspensionen ein Zustand zu sein, den das Gewebe möglichst schnell abzuändern versucht.

Da in den verschiedenen Geweben verschieden grosse Mengen abbauende Enzyme vorhanden sind (vgl. das folgende Kapitel), stand zu erwarten, dass die Optimalzeit des Nierengewebes nicht in allen anderen Geweben dieselbe sei. Tabelle Nr. 9 zeigt die Richtigkeit dieser Annahme. Da die verschiedenen Säuren, als Substrat verwendet, sich in bezug auf den zeitlichen Verlauf der CS-Kurve anscheinend gleich verhalten, wurden diese Versuche nur mit Brenztraubensäure ausgeführt. In den Geweben, in welchen viel abbauende Enzyme vorhanden sind, geht die Abnahme der gebildeten CS viel schneller vor sich. In der Leber wird das Maximum beispielsweise schon nach 15 Minuten Incubation erreicht.

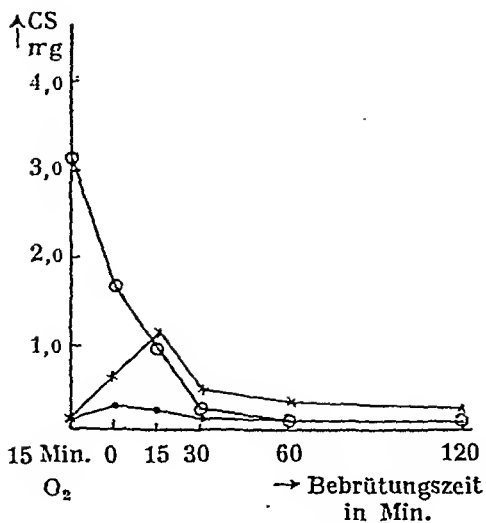


Abb. Nr. 2. Leber (aerob).

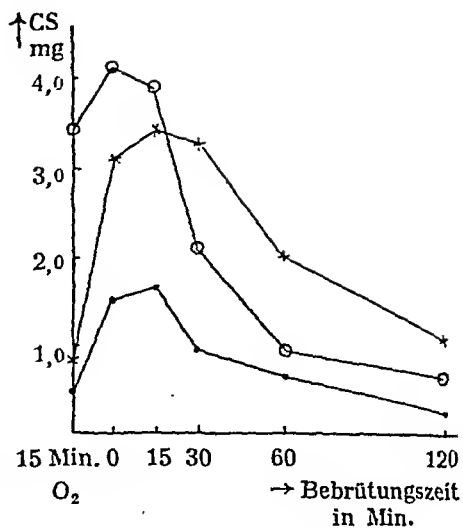


Abb. 3. Nierengewebe (aerob).

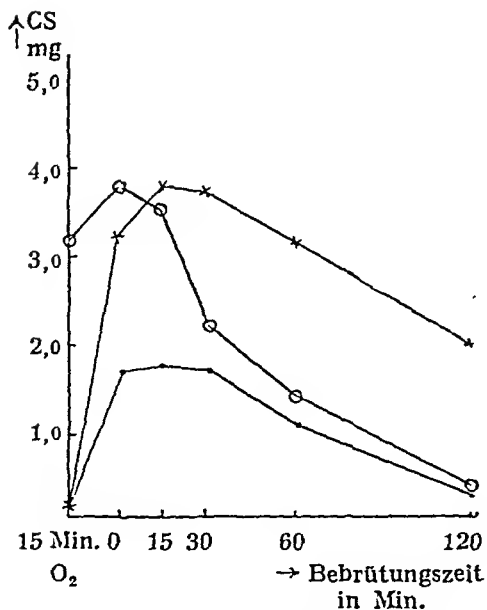


Abb. Nr. 4. Herzmuskel (aerob).

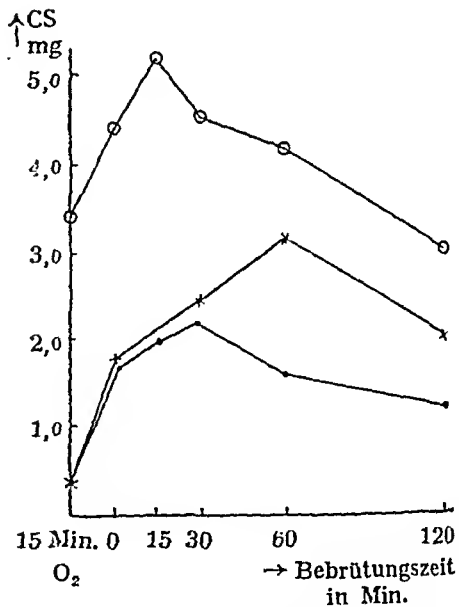


Abb. Nr. 5. Skelettmuskel (aerob).

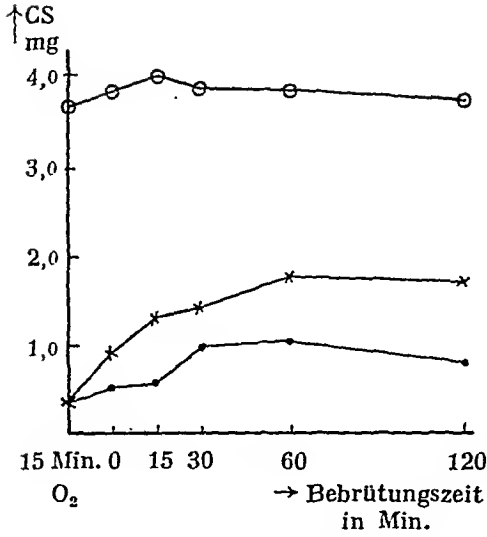


Abb. Nr. 6. Lunge (aerob).

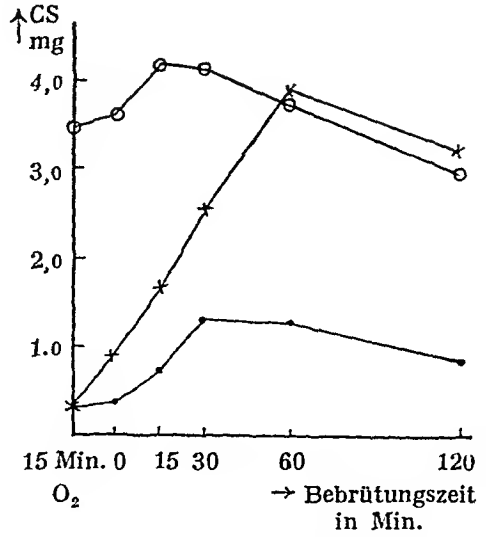


Abb. Nr. 7. Gehirn (aerob).

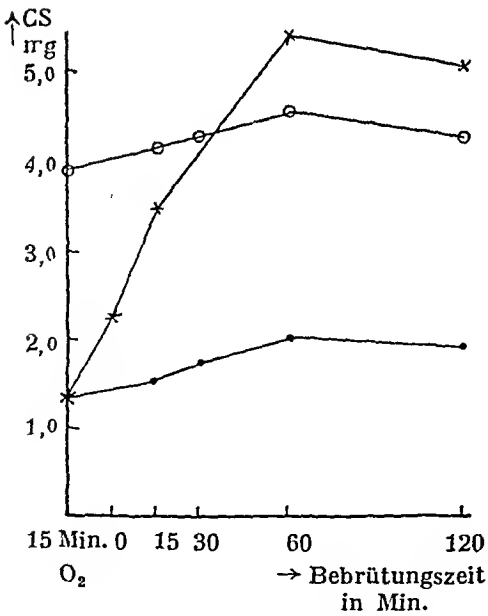


Abb. Nr. 8. Testis (aerob).

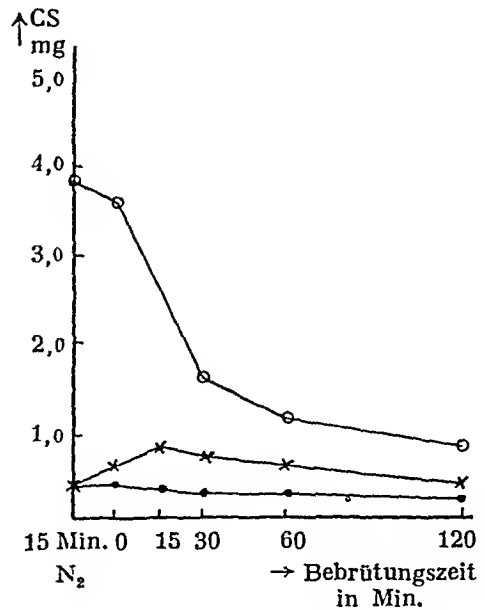


Abb. Nr. 9. Nierengewebe (anaerob).

Abb. Nr. 2—9. CS-Bildung und Abbau in verschiedenen Geweben.

- — — — • Spontane Veränderung
- × — — — × Veränderung nach Zusatz von Brenztraubensäure
- — — — ○ nach Zusatz von CS



Tabelle Nr. 9.

CS-Bildung aus Brenztraubensäure (m/50). CS in mg.

Zeit	Leber	Herz- muskel	Skelett- muskel	Lunge	Gehirn	Testis	Niere
Im Gewebe praefor- miert .....	0.13	0.10	0.36	0.38	0.28	1.36	0.82
Nach 15 Min.							
O <sub>2</sub> -Einleitung....	0.56	3.42	1.80	0.92	0.88	2.24	3.12
15 Min. Bebrütung	1.12	3.80	1.99	1.32	1.68	3.84	3.44
30 „ „	0.47	3.72	2.48	1.40	2.56	4.16	3.28
60 „ „	0.34	3.16	3.16	1.80	3.92	5.48	2.44
120 „ „	0.25	1.96	2.00	1.75	3.24	5.12	1.06

Die Abbildungen Nr. 2—8 geben ein deutliches Bild von der CS-Bildung in den Geweben und dem zeitlichen Verlauf ihres Abbaus. Gleichzeitig wurde nämlich auch der Schwund zugesetzter CS untersucht: hierbei wurden kleine Quantitäten verwendet, die den aus verschiedenen Säuren entstandenen CS-Mengen entsprechen. Unabhängig von dem Zusatz der CS nimmt ihre Menge anfangs in den Gewebesuspensionen zu. Es scheint aber, dass der CS-Gehalt auch in den Geweben, die nur wenig spaltende Enzyme enthalten, nicht unbegrenzt hoch ansteigt, denn auch schon hier beginnen die Werte nach einer Stunde abzunehmen.

Die Abbildung Nr. 9 (Tabelle Nr. 10) veranschaulicht, dass im Nierengewebe unter anaeroben Bedingungen spontan überhaupt keine CS gebildet wird. Zugesetzte CS verschwindet verhältnismässig rasch. Auch die nach Zusatz von Brenztraubensäure gefundenen CS-Werte erreichen nicht einmal annähernd die Grösse der aeroben Parallelversuche. Da die CS-Bildung unter anaeroben

Tabelle Nr. 10.

CS-Bildung und Abbau im Nierengewebe unter anaeroben Bedingungen. CS in mg.

Zeit	Spontan	Nach Zusatz von 3.0 mg CS	Nach Zusatz von Brenztrauben- säure m/50
Im Gewebe praeformierte CS..	0.40	3.84	0.40
Nach 15 Min. N <sub>2</sub> -Einleitung ..	0.37	3.60	0.60
15 Min. Bebrütung .....	0.32	—	0.85
30 „ „ .....	0.32	1.63	0.76
60 „ „ .....	0.27	1.18	0.65
120 „ „ .....	0.24	0.80	0.45

Bedingungen augenscheinlich sehr viel schwächer ist als unter aeroben, habe ich es in diesem Zusammenhange nicht für notwendig erachtet mehr Bestimmungen bei Abwesenheit von Sauerstoff auszuführen.

Auf Grund des Obengesagten wurde in der Folge bei den synthetischen Versuchen folgende Bebrütungszeiten benutzt:

- 15 Minuten: Leber.
- 30 » : Herzmuskel, Nieren.
- 60 » : Alle übrigen Gewebe.

**b. Reaktion.**

Die Gewebesuspensionen haben eine aussergewöhnlich starke Tendenz, die Reaktion nach der sauren Seite zu verschieben. Dies beruht wahrscheinlich, wenigstens teilweise daran, dass die von mir verwendeten Gewebesuspensionen relativ konzentriert waren (20 g Gewebe und 60 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit). Der gewöhnliche Phosphatpuffer nach Sörensen war nicht stark genug um die Reaktion auf die alkalische Seite hin zuverschieben. Um den Gebrauch zu starker Phosphatlösungen zu vermeiden wurden stattdessen Sörensen'sche Glycocollpuffer verwendet. Durch Zusatz von 2-n Natriumhydroxydlösung statt der 0.1-n Lösung wurde die gewünschte Reaktion erreicht. Daneben wurden verschieden starke Natriumbicarbonatlösungen und gewöhnliche Ringerlösung benutzt. — Die Reaktion der Suspensionen wurde nach der Bebrütung im Wärmeschrank, also vor der Eiweissausfällung, mit Farb-Indikatoren bestimmt.

Die verwendeten Pufferlösungen:

pH	6.0	Glycocollpuffer	.....	0.1 cm <sup>3</sup> HCl (1.0-n)
»	6.8	»	.....	—————
»	6.8	Ringerlösung	.....	—————
»	7.0	Glycocollpuffer	.....	0.1 cm <sup>3</sup> NaOH (2.0-n)
»	7.2	Natriumbicarbonat	..	0.2 % Lösung
»	7.5	Glycocollpuffer	.....	0.3 cm <sup>3</sup> NaOH
»	8.0	»	.....	0.5 » »
»	8.0	Natriumbicarbonat	..	1.0 % Lösung
»	8.3	Glycocollpuffer	.....	0.7 cm <sup>3</sup> NaOH
»	8.7	»	.....	1.0 » »
»	10.0	»	.....	3.0 » »
»	>10.0	»	.....	5.0 » »

Glycocollpuffer nach Sörensen: 0.1-n Glycocollösung (7.505 g/l)  
 0.1-n Kochsalzlösung (5.846 g/l)

Ringerlösung: 0.6 % NaCl  
 0.02 % KCl  
 0.02 % CaCl<sub>2</sub>  
 0.01 % NaHCO<sub>3</sub>

Die pH-Versuche wurden mit Nierengewebe ausgeführt. Tabelle Nr. 11 zeigt, dass das Optimum bei den verschiedenen Säuren etwas variiert. Im allgemeinen liegt es aber zwischen pH 7.5—8.0.

Tabelle Nr. 11

Der Einfluss des pH:s auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe. CS in mg.

Substrat (m/100)	pH										
	G <sup>1</sup>	G	R	G	B	G	G	B	G	G	G
	6.0	6.8	6.8	7.0	7.2	7.5	8.0	8.0	8.3	8.7	10.0
Brenztraubensäure	0.04	—	1.46	1.49	2.38	2.93	3.10	3.25	2.68	—	—
„	—	2.30	—	3.80	—	—	7.62	—	3.98	1.90	0.90
„	—	—	1.66	1.79	2.00	—	—	4.20	—	2.55	—
„	0	0.04	0.64	1.10	—	2.34	6.25	—	5.42	—	1.93
α-Ketoglutarsäure	—	2.46	2.46	6.71	—	—	4.16	—	0.42	—	0
„	2.51	5.65	—	7.01	7.10	7.26	7.02	6.00	—	—	—
Bernsteinsäure ....	—	0	0	0.40	0.72	0.95	1.15	1.25	1.00	0.90	0.40
Fumarsäure .....	—	1.02	—	3.23	3.35	3.53	2.34	2.34	1.61	0.79	—
„ .....	0	—	—	3.40	3.80	—	3.35	3.30	1.48	—	0.38
„ .....	0	—	1.35	3.53	—	3.28	2.69	—	1.15	—	—
l-Äpfelsäure .....	—	—	0.47	1.02	1.39	—	—	—	—	1.36	—
„ .....	—	0.13	—	1.23	—	1.83	2.51	—	1.70	1.11	—
„ .....	0	—	0.12	0.76	—	1.90	2.41	2.41	1.57	—	0.21
„ .....	—	—	—	1.41	—	3.02	2.02	—	1.66	—	—
β-Oxybuttersäure	0	0	0.17	0.97	—	—	1.57	—	2.32	—	0.46
„	—	0	—	0.47	0.61	0.98	1.62	1.98	1.96	1.83	0.92
„	—	—	—	—	—	2.43	2.77	—	2.09	2.09	—
Ohne Substrat ....	0	0	0	0.31	—	0.60	0.71	—	0.51	—	—
„ .....	0	0	0	0.20	0.30	0.51	0.82	1.15	0.90	0.40	0.10

<sup>1</sup> G = Glycocollpuffer

R = Ringerpuffer

B = Bicarbonatpuffer

Es scheint augenscheinlich, dass das Gewebe bestrebt ist mittels der CS die alkalische Reaktion nach der sauren Seite zu verschieben. Dies geht schon aus der Tatsache hervor, dass der CS-Gehalt der Lösungen zunimmt, obwohl keine für die CS-Bildung in Frage kommenden Verbindungen hinzugefügt werden. Das Gewebe kann also schon »aus eigenen Vorräten« CS synthetisieren. Dies bedeutet aber keineswegs, dass die Aufgabe der CS nur ausschliesslich in einer Regulierung der Gewebsreaktion zu sehen ist. Im Gegensatz wurde im vorhergehenden Kapitel gezeigt, dass in Gewebesuspensionen nach einer gewissen Zeit trotz der alkalischen Reaktion ein

Schwund an CS eintritt. Man könnte eher denken, dass das Gewebe als erste Massregel gegen einen derartigen unnormalen Zustand leicht zu erhaltende Verbindungen mobilisiert, unter diesen CS, deren Überschuss später als überflüssig wieder abgebaut würde. Die CS-Bildung kommt nur besser zum Vorschein beim Verwenden alkalischer Reaktion.

In saurem Milieu kommt es zu einer CS-Bildung nur nach Zusatz von  $\alpha$ -Ketoglutar säure. Dies übrigens ein Beispiel für das besondere Verhalten dieser Säure bei der CS-Bildung. Jedoch liegt das Optimum für diese Säure auch auf der alkalischen Seite.

Da die Optimalwerte der einzelnen Säuren ziemlich nahe bei einander liegen, ist der Einfachheit halber in allen folgenden Versuchen pH 8.0 und 1 % Natriumbicarbonatpuffer verwendet worden.

#### *Anhang:*

Schon früher wurde erwähnt, dass BREUSCH (1938) in seiner Arbeit den Befund von KREBS und JOHNSON (1937), nach welchem im Taubenbrustmuskel aus Oxal essigsäure CS entsteht, nicht bestätigen konnte. Beide Forscher hatten bei diesen Versuchen Ringerphosphat verwendet. Da meine Versuche zeigten, dass bei Verwendung gewöhnlicher Ringerlösung keine nennenswerte CS-Bildung aus den einzelnen Säuren zu beobachten war, schien es interessant zu untersuchen, welche Ergebnisse mit Taubenbrustmuskel bei alkalischer Reaktion eintreten. Mit der von BREUSCH benutzten CS-Methode nach COMETIANI (1931) können übrigens nur Mengen über 1 mg ermittelt werden. Wahrscheinlich handelte es sich bei den Ringerversuchen um viel kleinere Mengen.

Ferner behauptet BREUSCH (1938), dass auch aus Äpfelsäure und Fumarsäure keine CS gebildet würde. In meinen Versuchen wurden ausser den angeführten Säuren auch Brenztraubensäure allein und in Kombination mit 4-C-Diearbonsäuren verwendet.

Des Vergleichs halber wurden die Versuche genau mit den von dem angeführten Forscher benutzten 5-fachen Verdünnungen der Suspensionen vorgenommen. Ferner wurde bei diesen Versuchen eine halbe Stunde bebrütet. Bei Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Reaktion des Ringerphosphates nach Ablauf dieser Zeit pH 7.2 war. Mit 1 % Bicarbonat war das pH unter analogen Bedingungen dagegen 8.1. — Damit die Unterschiede deutlicher zum Vorschein kämen, wurde bei diesen Versuchen eine 2.5 mal grössere Suspensionsmenge als wie BREUSCH angab verwendet.

Die Lösungen: Ringerphosphat (BANGA und v. SZENT-GYÖRGYI, 1934):

100 Teile	0.6 % NaCl
4 „	1.15 % KCl]
1 „	2.11 % $\text{KH}_2\text{PO}_4$
1 „	3.82 % $\text{MgSO}_4$
21 „	des Gemisches: 40 ccm 0.25-m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	2 „ 1-n HCl

Tabelle Nr. 12.

Aerobe CS-Bildung im Taubenbrustmuskel. CS in mg. (10 g Gewebe, 50 cm<sup>3</sup> Pufferlösung.)

Substrat	Ringer-phosphat-puffer (pH = 7.2)	Na-bicarbonat-puffer (pH = 8.2)
Brenztraubensäure ..... (m/200)	0.32	1.06
l-Äpfelsäure ..... (m/200)	0.45	3.00
Oxalessigsäure ..... (m/200)	0.63	2.91
l-Äpfelsäure (m/200) und Brenztraubensäure (m/200)	0.80	5.45
Oxalessigsäure (m/200) und Brenztraubensäure (m/200)	1.26	6.55

Obwohl, statt der beinahe 0.06-m Oxalessigsäurelösung von BREUSCH, eine ca. 10-mal verdünnte benutzt wurde, kommt die CS-Bildung noch deutlich zum Vorschein. Bei den Ringerphosphatversuchen sind die Werte, obgleich sie, bedingt durch die Grösse des Volumens, beinahe das Dreifache der Ergebnisse der erwähnten Forscher ausmachen, so klein, dass sie nur gerade oder eventuell garnicht durch das Verfahren von COMMETIANI hätten nachgewiesen werden können (vgl. Tabelle Nr. 12). Wie zu erwarten stand, nahm die CS-Bildung, auch im Taubenbrustmuskel in alkalischer Umgebung zu. Bei gleichzeitigem Zusatz von Brenztraubensäure und 4-C-Dicarbonsäuren wurde mehr CS synthetisiert, als wie die Summe der Versuche mit beiden Substraten getrennt betrug. Auch bei Anwendung von Äpfelsäure allein wurde im Gegensatz zu der Behauptung von BREUSCH CS gebildet.

### c. Zugesezte Substratmenge.

Falls die CS-Bildung bei den Versuchen direkt proportional der zugesezten Stammsubstanz wäre, hätte der Gedanke an einen

anderen Vorgang als die enzymatische Reaktion, wie BREUSCH (1938) auf Grund seiner Versuchen mit Oxalessigsäure geltend macht, Berechtigung. Die enzymatischen Reaktionen sind bekanntlich nicht in stärkerem Grade abhängig von der Menge der vorhandenen Enzyme oder der miteinander reagierenden Verbindungen, sofern die letzteren nicht in giftigen Konzentrationen vorhanden sind. Im Gegenteil könnte man eher annehmen, dass bei derartigen Versuchen aus kleinen Mengen relativ mehr CS entstände, übersteigen doch die zugesetzten Säuremengen immer bedeutend die physiologischen Quantitäten.

Tabelle Nr. 13.

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe nach Zusatz verschiedener Substratmengen. CS in mg.*

Substrat	Zugesetzte Menge						
	m/12	m/25	m/50	m/100	m/200	m/400	m/800
Brenztraubensäure ....	2.94	2.70	2.10	2.00	1.90	1.60	—
$\alpha$ -Ketoglutarensäure ....	6.50	5.70	3.90	2.10	0.70	0.35	0
Bernsteinsäure .....	—	0.50	0.50	0.50	0.30	0.20	0.20
Fumarsäure .....	1.75	1.70	1.30	1.00	0.50	0.30	—
l-Äpfelsäure .....	1.00	1.00	0.90	0.90	0.70	0.30	0.30
Oxalessigsäure .....	7.60	7.50	6.10	5.70	5.10	3.80	—
Buttersäure .....	—	0.40	0.50	0.50	0.50	0.30	0.20
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	2.50	2.40	2.20	1.70	1.40	1.30	1.25

Die Tabelle Nr. 13 zeigt zwar, dass die CS-Bildung aus verschiedenen Säuren als Ausgangsstoffe mit steigender Menge zunimmt, jedoch ist diese Zunahme bei grösseren Konzentrationen im Verhältnis viel kleiner. Ihr Maximum scheint die CS-Bildung bei ca. m/10—m/25 Lösungen aller Säuren mit Ausnahme der  $\alpha$ -Ketoglutarensäure zu haben. Mit letzterer findet dagegen noch in Konzentrationen über m/25 eine Vermehrung der CS statt. Berechnet in Prozent der zugesetzten Substratmenge (Tabelle Nr. 14) erhält man auch mit  $\alpha$ -Ketoglutarensäure zwar anfangs eine Steigerung, aber dann kommt es zu einer plötzlichen Abnahme, wobei bei m/800 der 0-Wert erreicht wird (Abbildung Nr. 10). Das abweichende Verhalten dieser Säure bei der CS-Bildung deutet wiederum auf einen besonderen Prozess hin.

Was die anderen Substrate anbetrifft, wächst die CS-Bildung, berechnet in Prozent der zugesetzten Säuremenge, umso mehr zu

Tabelle Nr. 14.

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe in Prozent der zugesetzten Substrat-Menge.*

Substrat	Z u g e s e t z t e M e n g e						
	m/12	m/25	m/50	m/100	m/200	m/400	m/800
Brenztraubensäure ....	0.6	1.1	1.8	3.7	6.4	10.8	—
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ....	0.8	1.6	2.0	2.1	1.4	1.4	0
Bernsteinsäure .....	—	0.2	0.4	0.5	0.5	1.0	2.0
Fumarsäure .....	0.3	0.5	0.8	1.2	1.3	1.5	—
l-Äpfelsäure .....	0.2	0.3	0.5	0.9	1.1	1.3	2.6
Oxalessigsäure .....	1.1	2.1	3.4	6.3	11.3	12.5	—
Buttersäure .....	—	0.2	0.6	1.2	1.6	1.6	—
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	0.3	0.7	1.2	1.9	3.1	5.7	11.2

je kleineren Konzentrationen man kommt (Tabelle Nr. 14). Besondere Aufmerksamkeit verdienen Oxalessigsäure, Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure, die alle die 10 % Grenze überstiegen. Durch die anderen 4-C-Dicarbonsäuren wird nur ein viel geringerer Anstieg bewirkt. Diese Resultate sind in anschaulicher Weise in den Abbildungen Nr. 11 und 12 dargestellt. Als typische Beispiele sind Versuche mit l-Äpfelsäure und Brenztraubensäure angeführt. Zum Vergleich ist in der Abbildung Nr. 13 die entsprechende CS-Bildung bei Kombination von l-Äpfelsäure mit Brenztraubensäure verzeichnet.

Diese Versuche zeigen deutlich, dass die CS-Bildung wenigstens nicht durch zu grosse Substratmengen hervorgerufen wird. — Um grössere CS-Werte zu erhalten habe ich mich bei meinen Versuchen nicht immer unbedingt an die wirksamste Konzentration gehalten, sondern verhältnismässig starke Lösungen (m/50) benutzt.

Bei meinen Versuchen wurden im allgemeinen die verschiedenen Säuren im molaren Verhältnis hinzugesetzt. Natürlich wäre es auch möglich gewesen, die verschiedenen Verbindungen im Verhältnis der C-Atome zu verwenden oder eventuell absolut gleiche Gewichtsmengen derselben. Die Mengen der gewöhnlicheren Säuren unterscheiden sich aber nur sehr wenig bei Benutzung dieser verschiedenen Vergleichsmaßstäbe. Die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure enthält allerdings 5 C-Atome und die Brenztraubensäure nur 3, aber in den meisten anderen Verbindungen sind 4. Demnach wäre zur Bildung eines Moleküles CS mehr Brenztraubensäure als  $\alpha$ -Ketoglutarsäure notwendig, vorausgesetzt, dass jedes C-Atom verwendet würde. Da die CS aber selbst 6 C-Atome enthält wären

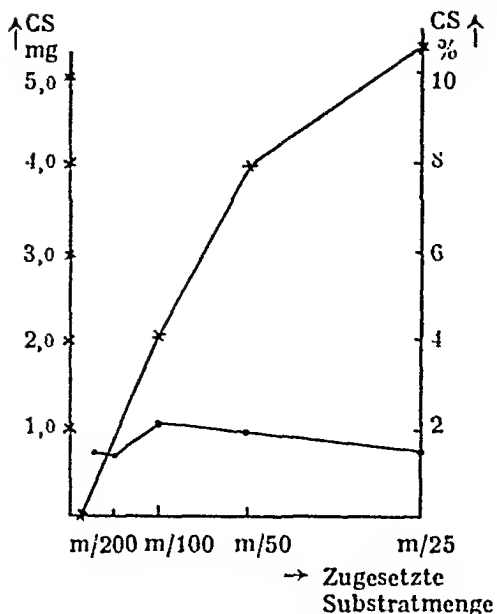


Abb. Nr. 10.  $\alpha$ -Ketoglutaric acid

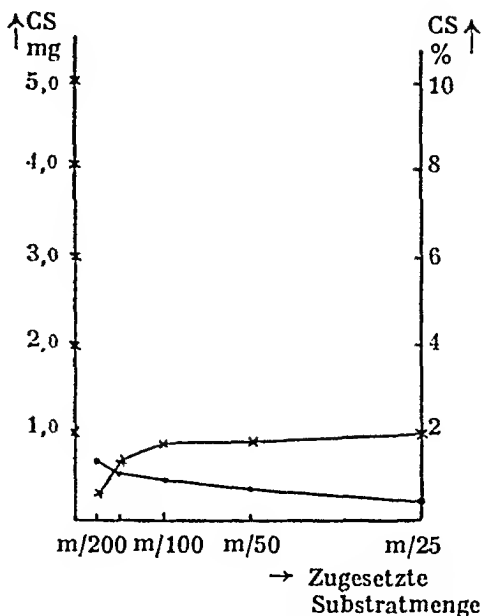


Abb. Nr. 11. l-Appleic acid

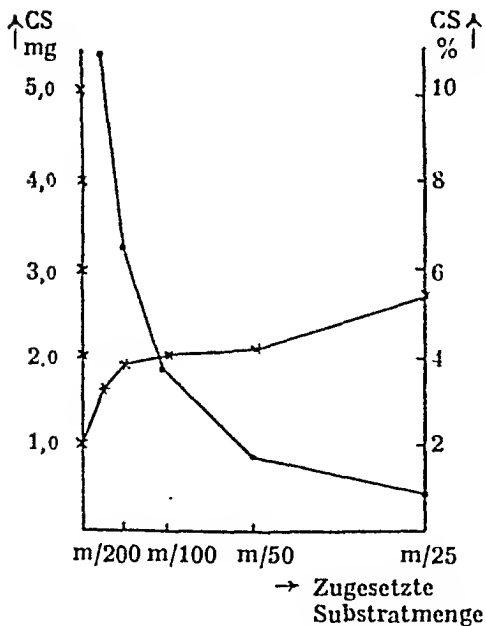


Abb. Nr. 12. Brenztraubensäure

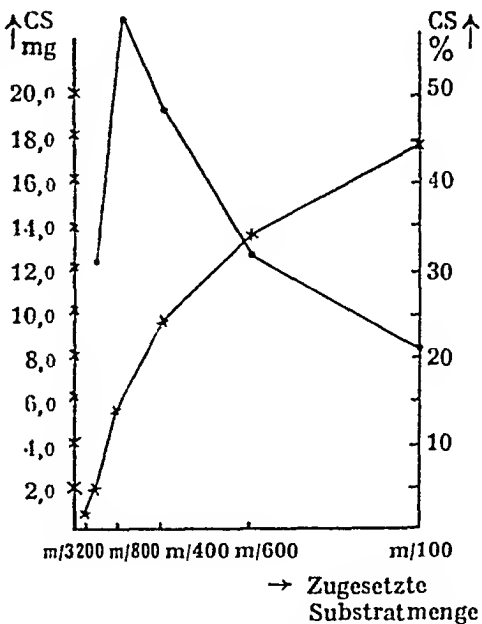


Abb. Nr. 13. Brenztraubensäure und l-Appleic acid (4-m:1-m)

Abb. Nr. 10—13. CS-Bildung in Nierengewebe nach Zusatz verschiedener Säuremengen.

× — × CS in mg.

• — • CS berechnet in % der zugesetzten Substratmengen.



Tabelle Nr. 15.

Die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe nach Zusatz der Säuren in verschiedenen Vergleichsverhältnissen, bezogen auf die gleiche Brenztraubensäuremenge, CS in mg.

Substrat	Im molaren Verhältnis m/50	Im Verhältnis der C-atome	Im absolutem Gewichtsverhältnis 0.15 %
Brenztraubensäure .....	1.87	1.67	1.79
$\alpha$ -Ketoglutarsäure .....	4.00	2.77	2.64
Bernsteinsäure .....	1.53	0.90	0.82
Fumarsäure .....	3.49	1.33	1.95
l-Äpfelsäure .....	3.03	1.33	1.70
Oxalessigsäure .....	3.65	2.43	2.40
Buttersäure .....	0.94	0.53	0.26
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	1.03	1.41	0.85

auf jeden Fall zur Synthese eines Moleküls CS zwei Moleküle  $\alpha$ -Ketoglutarsäure nötig, welche Menge auch für Brenztraubensäure ausreichend wäre.

Die Tabelle Nr. 15, in welcher die Brenztraubensäure bei allen Versuchen konstant gehalten wurde und die anderen Verbindungen im Verhältnis zu ihr variiert wurden, zeigt, dass keine grösseren Unterschiede in der Stärke der CS-Bildung bei Verwendung der verschiedenen Arten zu beobachten ist.

#### d. Bebrütungstemperatur.

Bei allen Versuchen wurde die Bebrütung im Thermostat von 37° C vorgenommen. Obgleich der Einfluss der Incubationswärme nicht in zusammenhängenden Versuchsreihen geprüft wurde, kann auf Grund von einigen orientierenden Versuchen ohneweiteres gesagt werden, dass sie von grosser Bedeutung für die CS-Bildung ist. Sowohl bei höherer als auch bei niederer Temperatur ist die CS-Synthese viel schwächer.

In diesem Zusammenhange muss noch hervorgehoben werden, dass bei Verwendung von gekochtem Gewebe anstatt des nativen Gewebes überhaupt keine CS-Synthese stattfindet, auch nicht in Gegenwart von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure. Diese Tatsache habe ich wiederholt konstatiert, sowohl bei Verwendung der zu prüfenden Substratsäuren allein als auch bei Kombinationsversuchen. Es kann sich also keineswegs um eine katalytische Wirkung der Gewebsmasse handeln, sondern ist die CS-Bildung tatsächlich als eine enzymatische Reaktion anzusehen.

e. *Gewebsgifte.*

Ausser der im Verlaufe meiner Untersuchungen erschienenen Arbeit von BREUSCH (1939), in welcher die Wirkung von Fluorid, Cyanid, Arsenit und Jodessigsäure auf die CS-Bildung bei Kombination von Brenztraubensäure mit Oxalessigsäure erwähnt wird, sind in dem Schrifttum keine Angaben über die Wirkung von Gewebsgiften zu finden. Auch BREUSCH hat die Frage nicht geklärt auf welche der beiden Teilkomponenten bei der CS-Bildung sich die Giftwirkung bezieht.

Diese Versuche wurden, ebenso wie der überwiegende Teil der im Vorhergehenden erläuterten, mit Nierengewebe ausgeführt; daneben aber auch mit Testis. Dies, weil in diesem Gewebe verhältnismässig wenig die CS abbauenden Enzyme vorhanden sind (vgl. Abbildung Nr. 8) und die CS-Bildung, wenigstens aus Brenztraubensäure, relativ stark ist.

Die Säuren wurden in allen Versuchen in m/50 Konzentration verwendet. Die Bebrütungszeit des Nierengewebes betrug 30 Minuten, des Testisgewebes wiederum 60 Minuten. Die Versuche wurden in Gegenwart von Sauerstoff vorgenommen. — Die Giftwirkung wurde geprüft durch Ansatz eines Parallelversuches, dem aber kein Gift zugesetzt wurde, und Vergleich der CS-Menge in beiden.

*Arsenigsäure.*

Tabelle Nr. 16 veranschaulicht die Wirkung der Arsenigsäure bei Versuchen mit Nierengewebe, die Tabelle Nr. 17 bei Versuchen mit Testis. Die Ergebnisse sind im Grossen und Ganzen in beiden Geweben entsprechend, jedoch kommt die Giftwirkung im Nierengewebe deutlicher zum Vorschein. Die CS-Bildung ist ziemlich gleichmässig nach Zusatz aller Säuren gehemmt.

Bei früheren Versuchen haben MARTIUS und KNOOP (1937) und KREBS, SALVIN und JOHNSON (1938) in Leberpräparaten nach Vergiftung mit Arsenigsäure aus CS  $\alpha$ -Ketoglutarsäure erhalten. Ebenso konnte KREBS (1933) im Nierengewebe aus Aminosäuren entstehende  $\alpha$ -Ketosäuren isolieren, aber aus Glutaminsäure erhielt er die entsprechende Ketosäure, die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, erst nach Vergiftung mit Arsenigsäure. Dieses Gift hemmte also anscheinend den weiteren Abbau dieser Säure. Derselbe Effekt tritt auch bei meinen Versuchen ein:  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, welche normaler Weise eine Zunahme der CS-Bildung hervorruft, hat diese Wirkung nicht in Gegenwart des Giftes.

BANGA (1936) erhält bei seinen Gewebesatmungsversuchen

Tabelle Nr. 16.

Die Wirkung von Arsenigsäure (Na) auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe.

Substrat (m/50)	G e b i l d e t e C S				
	Ohne Arsenig- säure in mg (= 100 %)	m/1000 Arsenigsäure		m/600 Arsenigsäure	
		in mg	in %	in mg	in %
Brenztraubensäure ..	2.40	0.10	4	0	0
$\alpha$ -Ketoglutarensäure ..	4.10	0.70	17	0.20	5
Bernsteinsäure .....	0.60	0	0	0	0
Fumarsäure .....	2.10	0.30	14	0.20	9
l-Äpfelsäure .....	2.70	0.20	8	0.10	4
Buttersäure .....	0.80	—	—	0	0
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	2.30	0.40	17	0.30	13
Ohne Substrat .....	0.60	0	0	0	0

Tabelle Nr. 17.

Die Wirkung von Arsenigsäure (Na) auf die aerobe CS-Bildung in Testis.

Substrat (m/50)	G e b i l d e t e C S									
	Ohne Arsenig- säure in mg (= 100 %)	m/1000 Arsenig- säure		m/600 Arsenig- säure		m/400 Arsenig- säure		m/100 Arsenig- säure		
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	
Brenztraubensäure	2.80	0.20	7	0.10	4	0	0	0	0	
„	4.80	0.34	7	0.25	5	0.20	4	0	0	
„	2.10	0.30	11	—	—	—	—	—	—	
$\alpha$ -Ketoglutarensäure	4.30	1.70	40	1.10	26	0.80	20	0.20	5	
Bernsteinsäure ..	0.90	0.30	33	0.10	11	0.10	11	0	0	
Fumarsäure .....	5.10	1.40	27	1.30	25	0.90	18	0.80	16	
„ .....	3.10	0.60	19	0.50	16	0.50	16	0.30	10	
l-Äpfelsäure .....	2.60	1.10	42	1.00	39	0.50	19	0.20	8	
Buttersäure .....	0.60	0.10	6	0.10	6	0	0	—	—	
$\beta$ -Oxybuttersäure	0.80	0.40	50	0.30	38	0.20	25	0.10	13	
Ohne Substrat....	0.60	0.10	17	0	0	0	0	0	0	

Oxalessigsäure nur in Gegenwart von Arsenigsäure. Ohne dieses Gift wird nach ihm der grösste Teil wieder zurück zu l-Äpfelsäure umgesetzt. Die Arsenigsäure unterbricht also anscheinend das Atmungssystem der 4-C-Dicarbonsäuren von v. SZENT-GYÖRGYI.

Betrachten wir die Tatsachen von diesem Gesichtswinkel aus, erklärt es sich ohne weiteres, dass aus Brenztraubensäure allein keine CS entsteht. Einen Beweis für eine derartige Wirkung der Säuren gibt dies Ergebnis aber nicht. Ebenso gut können wir uns nämlich denken, dass die Arsenigsäure die CS-Bildung aus Brenztraubensäure direkt verhindert.

### Natriumcyanid.

Cyanid, als starkes Gift der Gewebsatmung, verhindert schon in ziemlich kleinen Konzentrationen den CS-Abbau (LANGECKER, 1934). Was wiederum die Bildung anbetrifft, zeigen die Tabellen Nr. 18 und 19, dass nicht alle Säuren die Fähigkeit verlieren,

Tabelle Nr. 18.

Die Wirkung von NaCN auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe.

Substrat (m/50)	G e b i l d e t e C S				
	Ohne NaCN in mg (= 100 %)	m/1000 NaCN		m/500 NaCN	
		in mg	in %	in mg	in %
Brenztraubensäure . . . .	2.40	1.20	50	1.00	42
$\alpha$ -Ketoglutarsäure . . . .	4.10	3.90	95	4.00	98
Bernsteinsäure . . . . .	0.60	—	—	0.15	25
Fumarsäure . . . . .	2.10	—	—	0.40	19
l-Äpfelsäure . . . . .	0.90	—	—	0	0
Buttersäure . . . . .	0.80	—	—	0.10	13
$\beta$ -Oxybuttersäure . . . .	2.30	0	0	0	0
Ohne Substrat . . . . .	0.60	0	0	0	0

weder im Nierengewebe noch in Testis, als Baustoffe bei der CS-Synthese mitzuwirken. Eine besondere Stellung nimmt wieder die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ein, in deren Gegenwart die Bildung besonders im Nierengewebe beinahe garnicht verhindert ist. Arsenigsäure und Cyanid wirken also entgegengesetzt. Vergleicht man den Effekt von Cyanid auf  $\alpha$ -Ketoglutarsäure einerseits und Bernsteinsäure, Fumarsäure und l-Äpfelsäure andererseits bemerkt man eine deutliche Hemmung der Wirkung der letzteren. Dies scheint wieder ein Hinweis dafür zu sein, dass die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure auch andere Wege verlaufen kann, als über die 4-C-Dicarbonensäuren, d. h. den Cyklus.

Auf die CS-Synthese bei Versuchen mit Brenztraubensäure

Tabelle Nr. 19.

Die Wirkung von NaCN auf die aerobe CS-Bildung in Testis.

Substrat (m/50)	Gebildete CS									
	Ohne NaCN in mg (= 100 %)	m/2000 NaCN		m/1000 NaCN		m/500 NaCN		m/250 NaCN		
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	
Brenztraubensäure	3.10	2.70	87	2.60	84	2.60	84	2.30	74	
„	4.00	3.60	90	—	—	2.40	60	—	—	
„	3.00	—	—	2.80	93	—	—	—	—	
$\alpha$ -Ketoglutarensäure	3.80	3.80	100	3.00	79	—	—	1.50	39	
„	4.80	—	—	4.10	86	—	—	—	—	
Fumarsäure ....	3.00	1.50	50	1.30	43	0.40	13	0.30	10	
„ ....	2.20	—	—	0.80	36	—	—	—	—	
„ ....	2.70	—	—	0.90	33	—	—	—	—	
l-Äpfelsäure.....	2.10	1.20	57	0.80	38	0.30	14	—	—	
Oxalessigsäure ..	7.50	—	—	6.00	80	—	—	—	—	
Buttersäure ....	1.90	0.35	18	0.30	16	0	0	0	0	
$\beta$ -Oxybuttersäure	1.20	0.35	29	—	—	0	0	0	0	
Ohne Substrat ..	0.80	0.30	38	0.20	25	0.10	13	0	0	

und Oxalessigsäure scheint Cyanid nicht so kräftig zu wirken wie bei den anderen. Ob dies dadurch zu erklären ist, dass die Oxal-essigsäure zu Brenztraubensäure decarboxyliert wird, wonach aus dieser CS entstände, ist schwer zu sagen.

Tabelle Nr. 20.

Die Wirkung von NaF auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe.

Substrat (m/50)	Gebildete CS					
	Ohne NaF in mg (= 100 %)	m/100 NaF		m/50 NaF		
		in mg	in %	in mg	in %	
Brenztraubensäure ..	2.40	1.80	75	2.00	83	
$\alpha$ -Ketoglutarensäure ..	4.10	2.40	59	2.20	54	
Bernsteinsäure .....	0.60	—	—	0.50	83	
Fumarsäure .....	2.10	1.60	76	1.60	76	
l-Äpfelsäure .....	2.70	2.40	89	2.30	85	
Buttersäure .....	0.80	—	—	0.60	75	
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	2.30	1.40	61	1.50	65	
Ohne Substrat .....	0.60	0.40	67	0.30	50	

Tabelle Nr. 21.

*Die Wirkung von NaF auf die aerobe CS-Bildung in Testis.*

Substrat (m/50)	G e b i l d e t e C S								
	Ohne NaF in mg (= 100 %)	m/100 NaF		m/50 NaF		m/25 NaF		m/10 NaF	
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
Brenztraubensäure	2.10	2.00	95	0.70	33	0.50	24	0.30	14
"	2.00	2.10	105	—	—	—	—	—	—
$\alpha$ -Ketoglutarensäure	4.20	3.80	91	3.30	79	2.50	60	1.10	26
Bernsteinsäure....	1.50	0.80	53	0.40	27	0.30	20	0.25	17
Fumarsäure .....	3.50	1.70	49	1.20	34	0.60	17	0.40	11
l-Äpfelsäure .....	1.10	0.40	36	0.25	23	0.10	9	0.10	9
Buttersäure .....	1.50	0.40	27	0.30	20	0.25	17	0.25	17
$\beta$ -Oxybuttersäure	1.60	1.40	87	1.10	69	0.30	19	0	0
Ohne Substrat....	0.60	0.40	67	0.30	50	0.20	33	0	0

*Natriumfluorid.*

Fluorid wirkt auf die synthetisierenden Enzyme sehr schwach ein (vgl. Tabelle Nr. 20 und 21). Eine fördernde Wirkung hat es aber auch nicht. In ganz grossen Konzentrationen (m/10) hört die Bildung zuletzt jedoch fast vollkommen auf.

*Toluol.*

Die Wirkung von Toluol wurde nur im Nierengewebe untersucht, indem auf die Suspension eine dünne Schicht gegossen

Tabelle Nr. 22.

*Die Wirkung von Toluol auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe.*

Substrat (m/50)	G e b i l d e t e C S		
	Ohne Toluol in mg (= 100 %)	10 cm <sup>3</sup> Toluol	
		in mg	in %
Brenztraubensäure .....	1.70	0.20	12
$\alpha$ -Ketoglutarensäure .....	4.10	1.20	29
Bernsteinsäure .....	0.60	0.20	33
Fumarsäure .....	2.10	0.50	24
l-Äpfelsäure .....	2.70	0.90	33
Buttersäure .....	0.80	0.25	31
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	2.30	0.50	22
Ohne Substrat .....	0.60	0.10	17

wurde, wonach kräftig geschüttelt wurde. Die Tabelle Nr. 22 demonstriert die durchgehend hemmende Wirkung dieses Giftes. Die Hemmung wird nicht durch Sauerstoffmangel verursacht, welcher dadurch entstehen könnte, dass die Toluolschicht den Kontakt des Gases mit dem Gewebe verhindert, denn ausser durch das kräftige Schütteln wird die Oberfläche der Suspension auch durch das Durchleiten des Sauerstoffs zerrissen.

### Malonsäure.

In Anbetracht des Befundes von QUASTEL (1926) und QUASTEL und WOOLDRIDGE (1928), dass die Malonsäure ein spezifisches die Dehydrierung der Bernsteinsäure hemmendes Gift sei, war es besonders interessant ihre Wirkung auf die CS-Bildung zu prüfen. Nach GÖSZY und v. SZENT-GYÖRGYI (1934) verhindert die Malonsäure die Bildung von Fumarsäure aus Bernsteinsäure und so auch die ganze Atmungskatalyse. Zu ähnlichem Befund sind auch BOYLAND und BOYLAND (1936) und GREVILLE (1936) gekommen. Nach BANGA (1936) soll die Fumarsäure wiederum die Wirkung der Malonsäure aufheben oder mit anderen Worten »konserviert die Fumarsäure die Gewebsatmung«.

Tabelle Nr. 23.

Die Wirkung von Malonat (Na) auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe.

Substrat (m/50)	Gebildete CS				
	Ohne Malonat in mg (= 100 %)	m/100 Malonat		m/50 Malonat	
		in mg	in %	in mg	in %
Brenztraubensäure ..	2.80	0.60	21	0.50	18
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	11.30	5.60	50	4.90	43
Bernsteinsäure .....	0.70	0.40	57	0.25	36
Fumarsäure .....	3.10	3.70	118	4.00	129
l-Äpfelsäure .....	1.70	2.30	135	2.70	159
Oxalessigsäure .....	1.80	2.30	128	—	—
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	1.10	0.30	27	0.11	10
Ohne Substrat .....	0.50	—	—	0.60	120

Tabelle Nr. 23 zeigt, dass die Malonsäure die CS-Bildung im Nierengewebe immer hemmt, ausser wenn als Substrat Fumarsäure, Äpfelsäure oder Oxalessigsäure vorhanden ist, durch welche die Bildung eher beschleunigt wird. Genauso verhalten sich auch die

Wasserproben, so dass Malonsäure, wenigstens scheinbar als Baustoff bei der CS-Synthese fungieren kann. — Am stärksten hemmt Malonsäure die CS-Bildung bei Zusatz von Brenztraubensäure oder  $\beta$ -Oxybuttersäure. v. SZENT-GYÖRGYI (1936) erhält im Muskel in Gegenwart von Malonsäure Acetonkörper. Vielleicht wurde auch bei meinen Versuchen ein Teil derselben derart umgesetzt.

Im Testisgewebe (Tabelle Nr. 24) hemmt die Malonsäure die CS-Bildung auch in Gegenwart von Fumarsäure oder Äpfelsäure. Bei Versuchen mit  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ist die Hemmung dagegen nicht so deutlich wie im Nierengewebe. Vielleicht geht die CS-Bildung zum grössten Teil in den Hoden über  $\alpha$ -Ketoglutarsäure

Tabelle Nr. 24.

Die Wirkung von Malonat (Na) auf die aerobe CS-Bildung in Testis.

Substrat (m/50)	Gebildete, CS						
	Ohne Malonat in mg (= 100 %)	m/150 Malonat		m/100 Malonat		m/50 Malonat	
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
Brenztraubensäure..	1.80	0.70	39	—	—	—	—
„ ..	3.40	3.00	88	0.50	15	—	—
„ ..	2.90	1.20	41	0	0	—	—
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	3.20	2.70	84	—	—	—	—
„ ..	3.80	—	—	3.50	92	3.20	84
Bernsteinsäure ....	0.75	0.40	52	—	—	—	—
„ ....	1.25	—	—	0.50	40	0.40	32
„ ....	1.50	0.80	53	0	0	0	0
Fumarsäure .....	1.50	1.20	80	—	—	—	—
„ .....	2.80	—	—	1.30	46	—	—
l-Äpfelsäure .....	2.20	1.50	68	—	—	—	—
„ .....	1.80	—	—	1.50	83	1.00	63
$\beta$ -Oxybuttersäure ..	1.60	0.30	19	0.15	10	—	—
Ohne Substrat ....	0.80	0.40	50	0.20	25	0.10	13

vorsich; dies würde die abweichende Wirkung der Malonsäure auf die im Cyklus nach der Bernsteinsäure kommende Fumarsäure und Äpfelsäure erklären.

*Zusammenfassung:* Die optimale Zeit der CS-Bildung nach der Sauerstoffeinleitung variiert im umgekehrten Verhältnis zu der Menge der in den verschiedenen Geweben vorhandenen abbauen-



den Enzyme. In Leber erhält man die grössten Werte nach 15 Minuten, im Herzmuskel und Nieren nach 30 Minuten und in den übrigen Geweben, die viel weniger abbauende Enzyme enthalten, nach 60 Minuten. Auch spontan, d. h. ohne Substratzusatz, kommt es zu einer Vermehrung der CS in den Suspensionen.

Die CS-Bildung geht in aeroben Verhältnissen gut vorsich, in anaeroben wird dagegen fast gar keine CS gebildet.

Die CS-Bildung geschieht bei alkalischer Reaktion, während bei saurer beinahe gar keine gebildet wird. Die einzige Ausnahme bildet die  $\alpha$ -Ketoglutar säure, in deren Gegenwart noch bei pH 6.0 eine CS-Bildung festzustellen ist. Das pH-Optimum für die verschiedenen Säuren wechselt zwischen pH 7.5—8.0. Steigt die alkalische Reaktion über pH 10 an, hört die CS-Bildung auf. Im Taubenbrustmuskel konnte im Gegensatz zu BREUSCH (1938) bei Zusatz von l-Äpfelsäure, Oxalessigsäure und ferner Brenztraubensäure eine CS-Bildung festgestellt werden, vorausgesetzt, dass die Reaktion genügend alkalisch war. Schon in Ringerlösung war eine Zunahme zu beobachten, wenn auch eine viel schwächere.

Die CS-Bildung ist bei Zusatz der verschiedenen Säuren nicht direkt proportional der zugesetzten Menge. Bei kleineren Substratmengen nimmt zwar die CS-Menge ab, aber prozentuell, bezogen auf die hinzugefügte Säurequantität, findet doch eine fortwährende Steigerung statt. Dies geht besonders deutlich aus den Versuchen mit Oxalessigsäure, Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure hervor, bei welchen man sogar über 10 % erhält. Die  $\alpha$ -Ketoglutar säure ruft dagegen keine derartige Zunahme der CS hervor, sondern sinkt die prozentuelle Ausbeute zu je kleineren Mengen man geht und hört zuletzt vollkommen auf (m/800).

Der Zusatz der Substrate im molaren Verhältnis, im Verhältnis der C-Atomzahl oder in absolutem Gewichtsverhältnis hat keinen nennenswerten Unterschied in der CS-Bildung zur Folge.

Die CS-Bildung geschieht am besten bei einer Temperatur von 37° C. Bei Anwendung gekochter Gewebsmasse bekommt man vollständig negative Resultate.

Von den versuchten Giften hemmt die Arsenigsäure durchgehend die CS-Bildung. Cyanid wirkt stark hemmend auf alle anderen Substrate mit Ausnahme von  $\alpha$ -Ketoglutar säure. Jedoch, auch die hemmende Wirkung auf Brenztraubensäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Oxalessigsäure ist kleiner als auf die anderen Säuren. — Die hindernde Wirkung von Fluorid wird erst in grösseren Konzentrationen deutlich. — Toluol hindert die CS-Bildung nach Zusatz aller in dieser Arbeit geprüften Verbindungen.

Die Malonsäure wirkt in Testis, wenigstens in gewissem Grade, hemmend auf die Synthese bei Anwesenheit jeder Säure, jedoch ist der Effekt auf  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure recht schwach. Im Nierengewebe hat die Malonsäure keinen Einfluss auf Fumarsäure, l-Äpfelsäure und Oxaloesigsäure.

## 2. Der Einfluss verschiedener Säuren auf die Citronensäurebildung.

### a. Orientierende Versuche mit Nieren und Testis.

In den bisher berichteten Versuchen wurde die CS-Bildung nur nach Zusatz von solchen Säuren untersucht, die sich schon früher als geeignete Ausgangsstoffe erwiesen hatten. Da aber anzunehmen stand, dass die CS-Bildung auch noch durch den Zusatz anderer, ihr in einer oder der anderen Beziehung nahestehender Verbindungen bewirkt werden kann, wie ich schon in einer früheren Arbeit (HALLMAN, 1938) zeigte, habe ich eine ganze Reihe systematischer Bestimmungen ausser mit den schon früher geprüften Substraten auch mit einigen neuen ausgeführt.

Die Versuche wurden mit Nierengewebe und Testis angestellt. Die zu prüfende Säure wurde in 0.02-m Menge zugesetzt und die Versuche wurde unter möglichst optimalen Versuchsbedingungen, über die im Vorhergehenden berichtet wurde, vorgenommen. — Die Versuche wurden als Serienbestimmungen ausgeführt, wobei in jeder Serie zur Kontrolle ein Versuch mit einem effektiven Substrat gemacht wurde.

Der Übersichtlichkeit halber sind in der Tabelle Nr. 25 alle Säuren angeführt, unabhängig davon, ob sie schon früher bei meinen Bestimmungen benutzt worden waren. Eine stärkere CS-Bildung ausser nach Zusatz der 4-C-Dicarbonsäuren,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Brenztraubensäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Buttersäure fand nur in einigen wenigen Fällen statt.

Es ist anzunehmen, dass die Bildung aus Milchsäure über Brenztraubensäure verläuft, umso mehr als sie immer kleiner ist als aus letzterer und die Milchsäure sicherlich im intermediären Stoffwechsel leicht zu Brenztraubensäure dehydriert werden kann. Die Tatsache, dass aus Brenztraubensäurealdol nicht mehr CS gebildet wird als aus Brenztraubensäure deutet daraufhin, dass der Prozess über die letztere Säure und nicht über Aldol verläuft.

Ausser in Versuchen mit n-Buttersäure kommt es auch nach Zusatz von iso-Buttersäure zur CS-Bildung, wenn auch in sehr geringem Grade. — Von der Malonsäure, war schon im Zusammenhang mit den Giftversuchen die Rede.

Tabelle Nr. 25.

Die aerobe CS-Bildung bei Zusatz verschiedener Substrate. CS in mg.

Substrat (m/50)	Nierengewebe		Testis	
	Serie I	Serie II	Serie I	Serie II
Acetaldehyd .....	0	0	0	0
Essigsäure .....	0	0	0	0
Glyeolsäure .....	0	0	0	0
Propionsäure .....	0	0	0	0
Mesoxalsäure .....	0.12	0	0.14	0
Milchsäure .....	0.92	0.73	0.45	0.55
Brenztraubensäure ....	1.00	2.02	3.00	3.22
Brenztraubensäurealdol	0.81	1.42	0.60	1.02
n-Buttersäure .....	0.95	1.00	0.81	1.42
iso-Buttersäure .....	0.10	0.14	0.11	0.08
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	1.40	2.00	0.79	0.76
Crotonsäure .....	0.20	0.18	0.35	0.17
Gluconsäure .....	0	0	0	0
Oxalsäure .....	0	0	0	0
Malonsäure .....	0.15	0.10	0	0
Tartronsäure .....	0	0	0	0
Bernsteinsäure .....	0.92	0.89	0.73	0.82
Fumarsäure .....	2.73	2.33	3.23	2.43
l-Äpfelsäure .....	2.20	2.00	3.62	1.85
l-Weinsäure .....	0	0	0	0
i-Weinsäure .....	1.31	0.62	0.83	0.44
Oxalessigsäure .....	5.82	6.02	3.23	5.79
Glutarsäure.....	0.18	0.08	0.10	0.07
$\alpha$ -Ketoglutarsäure.....	5.55	6.12	3.72	2.43
Acetondicarbonsäure....	0	0	0	0
Adipinsäure .....	0.14	0	0	0
Citraconsäure .....	1.23	1.00	1.11	0.72
Itaconsäure .....	0	0	0	0
Tricarallylsäure .....	0	0	0	0
$\beta$ -Glycerinphosphorsäure	0	0	0	0
Glucose .....	0	0	0	0

Sonderbarerweise hatte bei meinen Versuchen nur die i-Weinsäure eine Wirkung auf die CS-Bildung, während Versuche mit der l-Form ganz negativ ausfielen.<sup>1</sup> Die Bildung aus Weinsäure dürfte über die anderen 4-C-Dicarbonsäuren verlaufen.

<sup>1</sup> Die beiden Weinsäuren waren Präparate von Schering-Kahlbaum A. G., Berlin.

Von Verbindungen die ein ganz schwach positives Resultat ergaben sind noch Mesoxalsäure, Crotonsäure, Adipinsäure und Glutarsäure zu erwähnen, sowie von bisher nicht untersuchten Säuren Citraconsäure als die wirkungsvollste von diesen. Möglicherweise beruht die Wirkung der letztgenannten, dem Tierorganismus fremden Säuren auf einer Giftwirkung auf die CS abbauenden Enzyme, wie KRUSIUS (1940) in Erwägung gestellt hat.

Ein völlig negatives Ergebnis wurde erhalten mit Acetaldehyd, Essigsäure, Glycolsäure, Propionsäure, Gluconsäure, Tartronsäure, Maleinsäure, Acetondicarbonsäure, Itaconsäure, Tricarbaldehydsäure,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure und Glucose.

Mit Maleinsäure kamen SIMOLA und ALAPEUSO (1938) im Gehirn zu positivem Ergebnis, aber auch mit diesem Gewebe konnte ich trotz wiederholter Versuche nicht dasselbe Resultat finden.

Besondere Beachtung verdient das negative Ergebnis mit Acetondicarbonsäure, war es doch früher eine allgemein vertretene Ansicht, dass diese Säure das reguläre Abbauprodukt der CS darstelle. Auf Grund der Rückläufigkeit der meisten organischen Reaktionen hätte gemäss dieser Theorie wenigstens ein Überschuss von Acetondicarbonsäure zu CS umgesetzt werden müssen.

Das früher berichtete positive Resultat mit Glycolsäure dürfte durch irgendeinen Fehler bei der Versuchsmethodik bedingt gewesen sein (HALLMAN, 1938).

In der Tabelle Nr. 25 sind auch alle anderen Verbindungen, welche schon früher bei in-vitro-Versuchen Anlass zur Bildung von CS gaben, berücksichtigt worden mit Ausnahme von Acetessigsäure. SIMOLA und ALAPEUSO (1938) erhielten mit dieser im Gehirn ebenfalls positive Ergebnisse, wenn auch viel kleinere Werte als mit  $\beta$ -Oxybuttersäure und Buttersäure. Die eventuelle CS-Bildung aus Acetessigsäure müsste wohl über diese verlaufen.

In naher Beziehung zum Umsatz der Ketosäuren stehen im Organismus die Aminosäuren, deren Bildung aus ersteren schon vor langer Zeit nachgewiesen wurde (KNOOP, 1910; NEUBAUER und GROSS, 1910; KNOOP und KERTESS, 1911; EMBDEN und SCHMITZ, 1910, 1912; DAKIN und DUDLEY, 1914). NEBER (1935, 1936) gelang bei in-vitro-Versuchen die Bildung von Aminosäuren aus den entsprechenden Ketosäuren; die Reaktion war fest an die Zellstruktur geknüpft, war aber unabhängig von der Zellatmung. KREBS (1936) bestätigt diese Befunde und behauptet gleichzeitig, dass die Brenztraubensäure ein spezifischer H-Ionen-Donator sei, den andere Ketosäuren nicht ersetzen könnten.

KNOOP und OESTERLIN (1925, 1927) haben daraufhin gewiesen,

dass die Reaktion Ketosäure  $\rightarrow$  Aminosäure rückläufig ist und KREBS (1933) erhielt auch in-vitro aus Aminosäuren Ketosäuren und besonders durch Vergiftung mit Arsenigsäure aus Asparaginsäure Oxalessigsäure und aus Glutaminsäure  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, deren weiterer Abbau bei diesen Versuchen durch Arsenigsäure gehemmt wurde. BRAUNSTEIN und KRITZMANN (1937) sowie KRITZMANN (1938) und BRAUNSTEIN (1939) und v. EULER, ADLER, GÜNTHER und DAS (1938) heben hervor, dass die Aminogruppe der Glutaminsäure auch an andere Ketosäuren übertragen werden kann, wodurch die Bildung vieler Aminosäuren erklärt werden könnte. COHEN (1939) hat schliesslich festgestellt, dass eine derartige Umaminierung auch zwischen anderen Keto- und Aminosäuren als den erwähnten stattfinden kann.

Da in den Geweben bei Zusatz von Ketosäuren, besonders von Oxalessigsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, CS gebildet wurde, lag die Möglichkeit nahe zur Hand, dass dies auch der Fall sei bei Zusatz von Glutaminsäure oder Asparaginsäure. Die stärkste Desaminierung geschieht nach KREBS (1933) in Leber und Nieren, so dass die Nieren als Gewebe mit starker CS-Bildung besonders geeignet für diesbezügliche Versuche erschienen.

Tabelle Nr. 26.

*Die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe bei Zusatz von Aminosäuren. CS in mg.*

Substrat	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
l-Asparaginsäure .....	0.72	0.55	0.90	1.02
d,l-Asparaginsäure ....	0.90	1.23	1.44	1.73
l-Glutaminsäure .....	0	0	0	0
d,l-Glutaminsäure .....	0.11	0	0.15	0.18

Tabelle Nr. 26 zeigt, dass nach Zusatz von Glutaminsäure so gut wie gar keine CS entsteht. Dies kann eventuell in Beziehung gesetzt werden zu der schwachen CS-Bildung nach Zusatz von ganz kleinen Mengen  $\alpha$ -Ketoglutarsäure. Die Asparaginsäure gibt dagegen ein deutlich positives Ergebnis. Sonderbar ist es jedoch, dass bei Zusatz der physiologischen l-Form viel weniger CS gebildet wird als bei Zusatz der d,l-Form. KREBS (1935) erklärt, dass die dem Organismus fremden Aminosäuren viel schneller umgesetzt werden, da der Organismus bestrebt ist sie möglichst schnell zu eliminieren. Vielleicht entstehen im Körper bei der Aminosäure-

synthese beide Formen und die starke d-Desaminase wäre dazu da, die körperfremde Form direkt nach der Bildung umzusetzen. Hierauf deuten auch die Untersuchungen von KEILIN und HARTREE (1936) und FELIX, ZORN und DIRR-KALTENBACH (1937).

Auf Grund des im Vorhergehenden gesagten wurden zu den systematischen Versuchen mit verschiedenen Geweben folgende Säuren verwendet:

Brenztraubensäure  
 $\alpha$ -Ketoglutarsäure  
Bernsteinsäure  
Fumarsäure  
l-Äpfelsäure  
Oxalessigsäure  
 $\beta$ -Oxybuttersäure  
n-Buttersäure  
d,l,-Asparaginsäure

Es handelt sich also gerade um »die Cyklussäuren« und ferner um die zu diesen in Beziehung stehende  $\beta$ -Oxybuttersäure und Asparaginsäure. — Sicherheitshalber wurden ausserdem noch in allen Geweben Bestimmungen mit Acetondicarbonsäure ausgeführt, weil ja diese früher allgemein in nahe Verbindung zur CS gebracht wurde.

#### b. Die CS-Bildung in verschiedenen Geweben.

Als Einzige haben SIMOLA und HALLMAN (1938) sich mit der CS-Bildung in verschiedenen Geweben befasst. Da aber die Versuche in jener Untersuchung mit 2-stündiger Bebrütung ausgeführt wurden, geben sie kein wirkliches Bild von der Fähigkeit der einzelnen Gewebe CS zu bilden. Daher ist auch die Ausbeute durchgehend verhältnismässig klein. Als günstigstes Gewebe erwies sich Testis.

Die folgenden Versuche wurden als Serienbestimmungen ausgeführt. Im selben Gewebe sind daher die mit verschiedenen Säuren erhaltenen Werte ohne weiteres vergleichbar mit einander. Von den Gewebsserien, deren immer mehrere vorgenommen wurden, habe ich der Übersichtlichkeit halber nur die mit den grössten und den kleinsten Werten sowie den arithmetischen Durchschnittswert angeführt. Der überwiegende Teil der Bestimmungen wurde gerade mit den Geweben vorgenommen, in denen die Bildung auf Grund der orientierenden Versuche am grössten war. Die zu prüfenden Säuren wurden im molaren Verhältnis zugesetzt und als Bebrütungszeit wurde immer die schon früher bestimmte Optimalzeit gewählt. — Zu jedem Versuch wurden 20 g Gewebe verwendet, ausgenommen die Versuche mit Schilddrüse und Nebennieren, zu welchen, wegen der geringen Grösse der betreffenden Organe, 10 g verwendet wurden.

Unter aeroben Bedingungen kommt es zur CS-Bildung in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Schilddrüse<sup>1</sup>. Die verhältnismässig kleinen Werte im Lebergewebe (vgl. Tabelle Nr. 27 a) sind vielleicht teilweise dadurch zu erklären, dass hier besonders viel CS abbauende Enzyme sind. Gerade wegen dieser ist es natürlich schwer zu sagen, welches Gewebe am besten CS bildet, jedoch erhält man mit Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel und Testis so grosse Werte, (Tabelle Nr. 27 b, c, d, g) dass man mit ziemlicher Sicherheit annehmen kann, dass hier die Bildung viel grösser ist als in Lungen, Gehirn, Nebennieren, Thymus und Milz. (Tabelle Nr. e, f, h, i, j).

Tabelle Nr. 27.

*Aerobe CS-Bildung in verschiedenen Geweben. CS in mg. Substrat m/50.*

a) *Leber.*

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	4	0.1—0.6	0.39
$\alpha$ -Ketoglutarensäure.....	4	0.4—2.4	1.66
Bernsteinsäure .....	4	0.0—0.1	0.03
Fumarsäure .....	4	0.1—0.2	0.18
l-Äpfelsäure .....	4	0.1—0.2	0.19
Oxalessigsäure .....	2	0.6—0.7	0.65
Buttersäure .....	4	0.0—0.1	0.03
$\beta$ -Oxalbuttersäure .....	4	0.2—0.4	0.32
d,l-Asparaginsäure.....	1	—	0.12
Acetondicarbonsäure.....	1	—	0

b) *Herzmuskel.*

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	5	0.8—3.1	1.41
$\alpha$ -Ketoglutarensäure.....	5	3.9—21.7	9.83
Bernsteinsäure .....	5	0.3—3.2	1.45
Fumarsäure .....	5	0.7—3.3	2.44
l-Äpfelsäure .....	5	0.7—4.0	2.67
Oxalessigsäure .....	3	1.2—2.1	1.65
Buttersäure .....	3	0.0—0.2	0.05
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	3	0.0—0.1	0.03
d,l-Asparaginsäure.....	3	1.2—2.1	1.38
Acetondicarbonsäure.....	1	—	0

<sup>1</sup> Da die Ergebnisse mit Schilddrüsengewebe völlig negativ waren, sind sie in den Tabellen nicht angeführt worden.

## c) Nieren.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	4	0.8—1.0	0.88
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure.....	4	5.5—7.8	6.63
Bernsteinsäure .....	4	0.2—0.9	0.76
Fumarsäure .....	4	1.9—3.2	2.88
l-Äpfelsäure .....	4	1.1—2.3	2.10
Oxalessigsäure .....	2	5.8—8.0	6.90
Buttersäure .....	3	0.5—1.3	1.06
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	4	1.4—2.4	1.89
d,l-Asparaginsäure.....	3	0.9—2.0	1.25
Acetondicarbonensäure ....	1	—	0

## d) Skelettmuskel.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	4	0.1—0.5	0.27
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure.....	4	3.1—6.6	4.17
Bernsteinsäure .....	4	0.2—2.0	1.23
Fumarsäure .....	4	0.9—4.5	2.86
l-Äpfelsäure .....	4	0.9—5.7	3.33
Oxalessigsäure .....	2	3.2—7.2	5.20
Buttersäure .....	2	0.0—0.2	0.10
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	3	0.1—0.3	0.21
d,l-Asparaginsäure.....	2	0.2—0.3	0.25
Acetondicarbonensäure.....	1	—	0

## e) Lunge.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	3	0.3—2.2	1.48
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure.....	3	0.7—1.9	1.43
Bernsteinsäure .....	3	0.1—0.2	0.16
Fumarsäure .....	3	0.6—0.9	0.71
l-Äpfelsäure .....	3	0.5—1.1	0.78
Oxalessigsäure .....	2	1.5—2.1	1.85
Buttersäure .....	2	0.0—0.2	0.10
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	2	0.0—0.1	0.05
d,l-Asparaginsäure.....	2	0.3—0.4	0.35
Acetondicarbonensäure.....	1	—	0



## f) Gehirn.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	4	0.8—2.1	1.39
$\alpha$ -Ketoglutarsäure.....	4	0.2—1.5	0.76
Bernsteinsäure .....	4	0.3—0.8	0.60
Fumarsäure .....	4	0.8—1.4	1.16
l-Äpfelsäure .....	4	1.1—2.1	1.75
Oxalessigsäure .....	3	3.4—4.1	3.76
Buttersäure .....	2	0.2—0.3	0.25
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	3	0.5—1.3	0.93
d,l-Asparaginsäure.....	2	0.8—1.1	0.95
Acetondicarbonensäure.....	1	—	0

## g) Testis.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	5	1.8—4.6	3.24
$\alpha$ -Ketoglutarsäure.....	5	1.8—4.2	2.71
Bernsteinsäure .....	5	0.3—1.7	0.93
Fumarsäure .....	5	1.1—5.0	2.65
l-Äpfelsäure .....	5	1.1—3.0	2.05
Oxalessigsäure .....	2	4.2—7.5	5.35
Buttersäure .....	4	0.1—1.5	0.64
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	4	0.8—1.6	1.00
d,l-Asparaginsäure.....	2	1.4—1.8	1.60
Acetondicarbonensäure.....	1	—	0

## h) Nebennieren.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	2	1.4—1.6	1.50
$\alpha$ -Ketoglutarsäure.....	2	0.8—0.9	0.86
Bernsteinsäure .....	2	0.6—0.9	0.76
Fumarsäure .....	2	1.2—1.4	1.32
l-Äpfelsäure .....	2	1.4—1.5	1.45
Oxalessigsäure .....	1	—	2.35
Buttersäure .....	1	—	0.20
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	1	—	0.20
d,l-Asparaginsäure.....	1	—	0.54
Acetondicarbonensäure.....	1	—	0

## i) Milz.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	2	0.2—0.3	0.26
$\alpha$ -Ketoglutarsäure .....	2	1.6—3.0	2.30
Bernsteinsäure .....	2	0.1—0.1	0.10
Fumarsäure .....	2	0.1—0.2	0.15
l-Äpfelsäure .....	2	0.2—0.2	0.20
Oxalessigsäure .....	1	—	1.00
Buttersäure .....	1	—	0
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	1	—	0.20
d,l-Asparaginsäure .....	1	—	0.10
Acetondicarbonensäure .....	1	—	0

## j) Thymus.

Substrat	Zahl der Versuche	Grenzwerte	Mittelwert
Brenztraubensäure .....	2	1.8—2.4	2.10
$\alpha$ -Ketoglutarsäure .....	2	1.6—2.6	2.10
Bernsteinsäure .....	2	0.1—0.3	0.20
Fumarsäure .....	2	0.9—0.9	0.90
l-Äpfelsäure .....	2	1.0—1.4	1.20
Oxalessigsäure .....	1	—	3.50
Buttersäure .....	1	—	0.10
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	1	—	0.50
d,l-Asparaginsäure .....	1	—	0.45
Acetondicarbonensäure .....	1	—	0

Was die CS-Bildung bei Verwendung der verschiedenen Säuren anbetrifft, so weisen die einzelnen Gewebe ziemlich bedeutende Unterschiede auf. Erstens was die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure angeht, kann man die Gewebe in zwei Gruppen teilen. In Leber, Nieren, Hertzmuskel und Milz wird, verglichen mit den anderen Säuren, verhältnismässig sehr viel CS gebildet. Wenn wir diese Gewebe mit denen vergleichen, die am meisten die CS abbauende Enzyme enthalten, ist festzustellen, dass es sich gerade um dieselben Gewebe handelt, welche die CS am besten eliminieren können (vgl. folgendes Kapitel). Ausgehend von der Cyklustheorie müsste die Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure über Bernsteinsäure verlaufen. Die mit Bernsteinsäure erhaltenen, viel kleineren Werte deuten aber daraufhin, dass dies nicht der Fall wäre. Dies dürfte wieder ein

## Anaerobe CS-Bildung in verschie-

Substrat	Leber		Herzmuskel		Niere	
	Serie I	Serie II	Serie I	Serie II	Serie I	Serie II
Brenztraubensäure..	0	0.11	0.43	0.32	0	0.41
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	1.71	1.80	25.80	10.30	3.62	11.90
Bernsteinsäure ....	0	0	0	0.11	0	0
Fumarsäure .....	0.10	0	0.11	0.90	0.31	0.31
l-Äpfelsäure .....	0.10	0	0	0.61	0.30	0.12
Oxalessigsäure ....	—	0.92	—	—	1.62	1.81
Buttersäure .....	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -Oxybuttersäure ..	0	0	0.10	0	0	0
d,l-Asparaginsäure..	0	—	0.20	0.31	0	—
Acetondicarbonensäure	0	—	0	—	0	—

Beweis dafür sein, dass die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure auch einen anderen Weg verläuft. — Lunge, Gehirn, Testis, Nebennieren und Thymus, und von diesen besonders die drei zuerst genannten Gewebe, können im Vergleich zu den anderen Substraten nur viel weniger CS aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bilden, aber auch in ihnen muss die Bildung zwei verschiedene Wege gehen, denn auch hier sind die mit  $\alpha$ -Ketoglutarsäure erhaltenen Werte grösser als die mit Bernsteinsäure.

Nach Zusatz von 4-C-Dicarbonensäuren hat die Grösse der CS-Bildung in beinahe allen Geweben regelmässig die Reihenfolge Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Oxalessigsäure und ist die Bildung aus der letzten viel stärker als aus den anderen. Mit Ausnahme von Leber und Herzmuskel sind die Werte der Oxalessigsäure sogar grösser als die der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure. Die CS-Bildung kann also ebenfalls nicht nur über  $\alpha$ -Ketoglutarsäure verlaufen. Die Bernsteinsäure scheint die Grenze zwischen dieser und den 4-C-Dicarbonensäuren zu bilden. — Im Herzmuskel (vgl. Tabelle 27 b) ist die Bildung aus Äpfelsäure sonderbarerweise viel stärker als aus Oxalessigsäure. Vielleicht kann dies dadurch erklärt werden, dass die Oxalessigsäure schneller in einer anderen Richtung umgesetzt wird als wie aus ihr CS entsteht. Es scheint kaum wahrscheinlich, dass die Äpfelsäure als solche an der CS-Synthese beteiligt ist. — In Nieren und Testis wiederum wechseln Äpfelsäure und Fumarsäure den Platz in der Reihenfolge. Dieses Faktum scheint schwer zu erklären. Die Bernsteinsäure wirkt in allen Versuchen am schwächsten von allen 4-C-Dicarbonensäuren. Zur selben

Nr. 28.

denen Geweben. CS in mg.

Skelettmuskel		Lunge		Gehirn		Testis	
Serie I	Serie II	Serie I	Serie II	Serie I	Serie II	Serie I	Serie II
0.20	0.31	0.30	0.70	0.13	0.91	2.90	2.40
3.10	4.00	1.40	1.50	0.81	0.92	1.40	1.20
0.11	0	0.12	0.21	0	0	0	0
0.90	0.41	0.42	0.60	0.21	0.31	1.00	0.51
0.90	0.52	0.42	1.40	0.21	0.52	1.50	0.51
1.30	—	—	2.00	—	1.23	—	2.50
0	0	0	0.10	0	—	0	—
0	0	0	0	0	0	0.32	0
—	0	—	0	0.11	0.50	0	0.21
0	—	0	—	0	—	0	—

Gruppe gehört endlich auch noch die Asparaginsäure, mit der in allen Geweben positive Werte erhalten wurden. Im allgemeinen waren sie grösser als die der Bernsteinsäure aber kleiner als die der Fumarsäure. Die CS-Bildung im Skelettmuskel bei Zusatz von Asparaginsäure war jedoch verhältnismässig gering.

Eine eigene Gruppe bildet die Brenztraubensäure, deren CS-Werte in den verschiedenen Geweben im Vergleich zu den anderen Säuren bedeutend schwanken. Besonders in Herzmuskel, Nieren, und Skelettmuskel sind die Werte verhältnismässig klein. In Lungen, Gehirn, Testis, Nebennieren, Schilddrüse und Milz sind sie dagegen im Vergleich zu den 4-C-Dicarbonensäuren und der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure sehr hoch und übersteigen sogar die Werte der letzteren in vielen Fällen.

Die CS-Bildung nach Zusatz von Buttersäure ist regelmässig schwächer als nach  $\beta$ -Oxybuttersäure. In Herzmuskel, Skelettmuskel und Lungen bewirken beide nur eine sehr schwache Bildung. Am besten kommt der Bildungseffekt in Nieren zum Vorschein, wo er, was die  $\beta$ -Oxybuttersäure anbetrifft, sogar die Brenztraubensäure übersteigt. Sonst sind die Ergebnisse im allgemeinen etwas grösser als die entsprechenden der Bernsteinsäure.

Die Acetondicarbonensäure hat in keinem der Versuche ein positives Resultat ergeben, so dass sie als CS-Bildner wenigstens im Tierorganismus tatsächlich kaum in Frage kommen dürfte.

Vergleichshalber wurde auch eine ganze Reihe Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen ausgeführt (Tabelle Nr. 28). Wie

schon früher erwähnt wurde, ist die CS-Bildung bei Abwesenheit von Sauerstoff viel schlechter. Nur die  $\alpha$ -Ketoglutar-säure erwies sich hier teilweise als starker CS-Bildner (Herzmuskel). Dies deutet wiederum auf die direkte Bildung der CS aus  $\alpha$ -Ketoglutar-säure hin, denn die Dehydrierung der letzteren zu Bernsteinsäure verlangt die Gegenwart von Sauerstoff, geht also nicht unter anaeroben Bedingungen vor sich.

Von den anderen Säuren verdienen die Buttersäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure insofern Beachtung, als sie anaerob gar keine CS-Bildung veranlassen. Bei Zusatz von Oxalessäure ist die Synthese durchwegs noch am besten bewahrt. In Testis wurden bei anaeroben Versuchen aber auch mit anderen Säuren beachtenswerte Werte gefunden.

*Zusammenfassung:* In Nieren und Testis kommt es zur CS-Bildung nach Zusatz von Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutar-säure, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure, Fumarsäure, Oxalessäure, Buttersäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und in geringerem Grade auch nach Zusatz von d,l-Weinsäure und Citraconsäure. Von den Aminosäuren ist die Glutaminsäure ohne Wirkung, während die Asparaginsäure CS-Bildung hervorruft, wobei die dem Organismus fremde d,l-Form effektiver ist als die l-Form.

Acetaldehyd, Essigsäure, Glycolsäure, Propionsäure, Mesoxal-säure, Crotonsäure, Gluconsäure, Malonsäure, Tartronsäure, Malein-säure, l-Weinsäure, Glutarsäure, Acetondicarbon-säure, Adipinsäure, Itaconsäure, Tricarballylsäure,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure und Glucose rufen in den Gewebesuspensionen keine CS-Bildung hervor oder auch ist ihr Effekt ganz minimal. — Die Wirkung der Milchsäure, des Brenztraubensäurealdols kann vielleicht auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse durch ihre Umwandlung zu Brenztraubensäure erklärt werden.

Bei systematischen Versuchen wurden positive Resultate mit Leber, Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel, Lungen, Gehirn, Testis, Nebennieren, Milz und Thymus erhalten, während im Schilddrüsengewebe keine CS-Bildung erzielt wurde.

Die  $\alpha$ -Ketoglutar-säure erwies sich als bestes Substrat in den Geweben, die viel die CS abbauende Enzyme enthalten (Leber, Herzmuskel). Im allgemeinen wurde sonst in Gegenwart von Oxal-essäure am meisten CS gebildet, mit Ausnahme der Versuche im Herzmuskel, wo sowohl die l-Äpfelsäure als auch die Fumarsäure einen grösseren Effekt hatten. Abgesehen von dieser Ausnahme wuchs die Wirkung der 4-C-Dicarbon-säuren mit ihrem Oxyda-tionsgrad. Die Wirkung der Asparaginsäure lag meistens zwischen der Bernsteinsäure und Fumarsäure.

Die Wirkungsgrösse der Brenztraubensäure ist in Geweben, die viel die CS abbauende Enzyme enthalten ungefähr die Gleiche wie die der Bernsteinsäure (Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel), in den anderen wiederum kommt sie direkt nach der Oxalessigsäure (Lungen, Gehirn, Testis, Nebennieren, Milz, Thymus).

Bei Zusatz von Buttersäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure kommt es zu einer beachtenswerteren CS-Bildung nur in Nieren, Gehirn, Testis und Leber. In allen anderen Geweben mit Ausnahme der Nieren liegen die Werte unter den entsprechenden der Brenztraubensäure.

Unter anaeroben Bedingungen ist die CS-Bildung bei Zusatz aller Substrate mit Ausnahme der  $\alpha$ -Ketoglutarensäure sehr viel niedriger als bei den aeroben Versuchen.

### 3. Kombinationsversuche.

#### a. *Verschiedene Kombinationsmöglichkeiten.*

Bei der Durchsicht des Anteils der verschiedenen Säuren an der CS-Bildung zeigte es sich, dass die Säuren des KREBS'schen Cyklus alle als Ausgangsstoffe bei der Synthese fungieren können. Schon frühere Untersuchungen (MARTIUS und KNOOP, 1936; KREBS, 1937; SIMOLA, HALLMAN und ALAPEUSO, 1939; BREUSCH, 1939) wiesen daraufhin, dass die CS-Synthese zu guter letzt durch die 4-C-Dicarbonsäuren und ein Abbauprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels zustande kommt. Unter weiterer Berücksichtigung der vielseitigen Möglichkeiten, die vor allem im Zusammenhang mit Untersuchungen bei niederen Organismen diskutiert worden sind, war es von grossem Interesse zu untersuchen, zu welchem Ergebnis über die CS-Bildung man auf Grund der Gewebsversuche kommt.

Vor allem wurde beabsichtigt die Reaktion von einerseits den 4-C-Dicarbonsäuren und andererseits einem 3-C-atomigen möglichen Abbauprodukt des Zuckerumsatzes zu verfolgen. Hierzu standen zur Verfügung ausser der Brenztraubensäure Mesoxalsäure, Milchsäure, Tartronsäure und  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure. Auch die Buttersäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure, die wie schon oft gezeigt wurde, in naher Beziehung zum Brenztraubensäurestoffwechsel stehen (LOEB 1912; EMBDEN und OPPENHEIMER, 1912; GORR, 1932; ANNAU, 1934; EDSON, 1935; v. SZENT-GYÖRGYI, 1936; WEIL-MALHERBE, 1936; KREBS und JOHNSON, 1937) kamen hierbei in Frage. Weiter wurden einige, im Zusammenhang mit Untersuchungen über die CS-Bildung bei niederen Organismen erwähnte Verbindungen untersucht, obwohl

sie allein verwendet in meinen Versuchen keine Zunahme der CS hervorriefen. Dies waren Essigsäure (RAISTRICK und CLARK, 1919; VIRTANEN und PULKKI, 1930), Acetaldehyd (v. EULER, 1909), Glycolsäure (CHRZASZCS, 1931) und Oxalsäure (CLAISEN und HORI, 1891).

Die Versuche wurden ebenso wie alle späteren Kombinationsversuche derart ausgeführt, dass immer gleichzeitig mit dem Kombinationsversuch Bestimmungen mit jedem Substrat für sich vorgenommen wurden. Die Summe dieser beiden Parallelversuche wurde dann mit dem Kombinationsversuch verglichen, zu dem beide Säuren in gleicher Gesamtmenge wie zu ersteren zugesetzt worden waren. — Die Versuche wurden mit Nierengewebe (20 g) unter aeroben Bedingungen und einer Bebrütungszeit von 30 Minuten (37°) vorgenommen. Die Säuren wurden in 0.01-m Menge zugesetzt.

Tabelle Nr. 29 a und b zeigen, dass Brenztraubensäure zusammen mit Äpfelsäure oder Fumarsäure eine viel grössere CS-Ausbeute gibt als wie die Summe der Versuche mit jeder Säure allein beträgt. Bei Kombination der beiden ersteren Säuren war der Kombinationswert beispielsweise mehr als dreimal grösser als die Summe der beiden getrennten Versuche. Auch Milchsäure gab bei Kombinationsversuchen positive, wenn auch viel weniger starke Resultate, während die  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, Mesoxalsäure und Tartronsäure sich gänzlich negativ verhielten, ja sogar die Bildung aus Fumarsäure bzw. Äpfelsäure allein hemmten.

Tabelle Nr. 29.

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe bei Kombination verschiedener Substrate (m/50) mit 4-C-Dicarbonsäuren (m/50). CS in mg.*

## a) l-Äpfelsäure.

Substrat	Substrat allein	l-Äpfelsäure allein	Summe	Kombinationsversuch	Unterschied
Acetaldehyd .....	0	1.70	1.70	0	— 1.70
Glycolsäure .....	0	1.70	1.70	0.50	— 1.20
Essigsäure .....	0	1.70	1.70	1.92	+ 0.22
Oxalsäure .....	0	1.70	1.70	1.0	— 0.70
Tartronsäure .....	0	1.70	1.70	0.80	— 0.90
Mesoxalsäure.....	0.10	1.82	1.92	1.32	— 0.60
Milchsäure .....	0.71	0.80	1.51	2.90	+ 1.41
Brenztraubensäure ....	1.00	2.00	3.00	10.5	+ 7.50
Buttersäure .....	0.52	1.82	2.34	1.14	— 1.20
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	0.80	1.32	2.12	4.44	+ 2.32
$\beta$ -Glycerinphosphorsäure	0	1.50	1.50	1.00	— 0.50

## b) Fumarsäure.

Substrat	Substrat allein	Fumar-säure allein	Summe	Kombi-nations-versuch	Unter-schied
Asetaldehyd .....	0	1.80	1.80	0	— 1.80
Glycolsäure .....	0	1.80	1.80	0.80	— 1.00
Essigsäure .....	0	1.02	1.02	1.14	+ 0.12
Oxalsäure .....	0	1.80	1.80	0.50	— 1.30
Tartronsäure .....	0	1.80	1.80	1.20	— 0.60
Mesoxalsäure .....	0.11	1.61	1.72	1.22	— 0.50
Milchsäure .....	0.71	0.71	1.42	2.13	+ 0.71
Brenztraubensäure ....	1.00	2.00	3.00	8.10	+ 5.10
Buttersäure .....	0.52	1.61	2.13	1.23	— 0.90
$\beta$ -Oxybuttersäure ....	0.80	1.22	2.02	3.84	+ 1.82
$\beta$ -Glycerinphosphorsäure	0	1.02	1.02	0.85	— 0.23

Die  $\beta$ -Oxybuttersäure erwies sich im Gegensatz zur Buttersäure als geeignet für Kombinationsversuche. Von 2-C-atomigen Verbindungen rief nur die Essigsäure eine sehr schwache Zunahme der CS-Bildung hervor, während die anderen geprüften Verbindungen eher eine Abnahme veranlassten.

Es stellte sich also heraus, dass ausser der Brenztraubensäure nur ihre Vorstufe, die Milchsäure und ferner noch die  $\beta$ -Oxybuttersäure und die Essigsäure Anzeichen einer möglichen Beschleunigung der CS-Bildung in Gegenwart von Fumarsäure oder Äpfelsäure zeigten. Andererseits war es aber auch interessant zu untersuchen, welche anderen Säuren imstande waren, die CS-Bildung in Gegenwart von Brenztraubensäure zu erhöhen.

Was die 4-C-Dicarbonensäuren anbetrifft (Tabelle Nr. 30), zeigte es sich, wie zu erwarten stand, dass die letzte Oxydationsstufe, die Oxalessigsäure die CS-Bildung am meisten steigerte, sogar bis zu ca. 500 %. Je weiter zurück man geht, desto kleiner wird die Steigerung. Jedoch ruft noch die Vorstufe der Bernsteinsäure, die  $\alpha$ -Ketoglutarensäure eine deutliche Zunahme der CS-Bildung hervor. Ziemlich hohe Werte gibt bei Kombination mit Brenztraubensäure auch die Asparaginsäure, anseheinend auf Grund der direkt aus ihr durch Desaminierung entstehenden Oxalessigsäure.

Die von SIMOLA (1938) in Betracht gezogene Möglichkeit, dass die CS aus Acetonkörpern über  $\beta$ -Oxybuttersäure zu Äpfelsäure gebildet würde, scheint wenigstens für dieses Gewebe sehr wenig wahrscheinlich. Wenn dies nämlich der Fall wäre, müsste die  $\beta$ -Oxybuttersäure ähnlich wie die Äpfelsäure die CS-Bildung aus Brenztraubensäure



Tabelle Nr. 30.

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe bei Kombination verschiedener Substrate mit Brenztraubensäure.*

Substrat	Summe Brenztraubens. + Substrat	m-Verhältnis Brenztraubens.: Substrat	CS in mg				
			Substrat allein	Brenz- traubens. allein	Summe	Kombi- nations- versuch	Unter- schied
$\alpha$ -Ketoglutarensäure	m/100	3: 2	2.40	0.62	3.02	4.40	+ 1.38
„ ..	m/100	1: 1	2.00	0.86	2.86	4.40	+ 1.54
„ ..	m/100	1: 1	1.90	0.79	2.69	4.42	+ 1.73
„ ..	m/150	1: 5	1.90	0.74	2.64	3.89	+ 1.25
„ ..	m/150	1: 5	2.49	4.62	2.49	4.62	+ 2.13
Bernsteinsäure....	m/40	2: 1	1.20	1.43	2.63	4.37	+ 1.74
Fumarsäure ....	m/40	2: 1	1.64	1.33	2.97	8.13	+ 5.16
l-Äpfelsäure ....	m/40	2: 1	1.64	1.33	2.97	9.13	+ 6.76
„ ....	m/50	1: 1	1.73	1.17	2.90	13.18	+ 10.28
„ ....	m/100	1: 1	2.20	0.94	3.14	10.45	+ 7.31
„ ....	m/100	1: 1	1.95	1.07	3.02	10.45	+ 7.43
„ ....	m/100	1: 1	1.28	1.00	2.28	10.72	+ 8.54
„ ....	m/200	2: 1	1.90	1.30	3.20	7.88	+ 4.68
Oxalessigsäure ..	m/150	1: 1	2.40	0.75	3.15	10.62	+ 7.47
„ ..	m/150	2: 1	2.20	0.87	3.07	17.46	+ 14.39
$\beta$ -Oxybuttersäure	m/100	1: 1	4.00	1.43	5.43	0.84	— 4.59
„ ..	m/150	2: 1	3.27	1.02	4.25	1.25	— 3.00
„ ..	m/200	1: 2	4.30	1.16	5.46	2.75	— 2.71
d,l-Asparaginsäure	m/40	2: 1	1.40	1.20	2.60	15.90	+ 13.30
„ ..	m/100	1: 1	1.60	1.20	2.80	8.80	+ 6.00
„ ..	m/200	1: 2	1.60	0.80	2.40	6.90	+ 4.50
Citraconsäure ....	m/50	1: 1	1.30	1.50	2.80	3.25	+ 0.45

steigern. In welchem Verhältnis wir aber auch die Säuren kombinieren, immer ist das Ergebnis mit ersterer entgegengesetzt. Vergleichen wir hiermit Kombinationsversuche von Äpfelsäure mit  $\beta$ -Oxybuttersäure scheint es viel wahrscheinlicher, dass die Bildungswirkung der letzteren durch ihre Umsetzung zu Brenztraubensäure bedingt wird. — Die Citraconsäure, welche allein eine kleine Zunahme des CS-Gehalts hervorrief, gibt bei Kombination mit Brenztraubensäure keine grössere CS-Ausbeute.

Auf Grund der orientierenden Versuche mit Nierengewebe sind folgende weitere Kombinationsversuche durchgeführt worden:

1. Brenztraubensäure und 4-C-Dicarbonsäuren.
2.  $\beta$ -Oxybuttersäure und 4-C-Dicarbonsäuren.
3. Essigsäure und 4-C-Dicarbonsäuren.

b. *Brenztraubensäure und 4-C-Dicarbonsäuren.*

1. Kombinationsversuche in verschiedenen Geweben.

Die im Vorhergehenden berichteten Ergebnisse waren das Resultat verschiedener, nicht immer zusammenhängender Bestimmungen im Nierengewebe. Zur näheren Klärung der Frage der CS-Bildung im ganzen Tierkörper, wurden mit verschiedenen Geweben eine Reihe systematischer Versuche ausgeführt, bei welchen die einzelnen Säuren kombiniert mit Brenztraubensäure in völlig parallel verlaufenden Versuchsserien geprüft wurden. Die so erhaltenen Ergebnisse waren direkt vergleichbar mit einander und zeigen einwandfrei die Wirkung der verschiedenen Säuren bei Kombinationsversuchen.

Ausser, dass die Versuche mit den einzelnen Säuren zusammen mit Brenztraubensäure als Parallelbestimmungen ausgeführt wurden, ist genau wie bei den ersten Kombinationsversuchen auch die CS-Bildung mit jeder Säure für sich bestimmt und die Summe der so erhaltenen Werte mit dem Kombinationswert verglichen worden. Alle Säuren kamen in den Versuchen in 0.01-m Konzentration zur Anwendung.

Die Schilddrüse gibt als einzigstes Gewebe völlig negative Resultate. Ebenso wie bei den Versuchen mit verschiedenen Säuren allein wurde auch jetzt keine CS gebildet. Zu demselben Ergebnis kommt man mit Blut, welches sowohl frisch und unhämolysiert als auch hämolysiert dasselbe negative Resultat gibt. Die Regulierung des Blut-CS-Spiegels dürfte daher höchst wahrscheinlich nur von den Geweben aus vorsichgehen.

In allen übrigen geprüften Geweben kommt der Kombinationseffekt mehr oder weniger deutlich zum Vorschein (Tabelle Nr. 31 a—j). Bei Durchsicht der Kombinationsversuche in ein und demselben Gewebe kann man nicht umhin festzustellen, dass die absoluten Mengen nach Zusatz der verschiedenen 4-C-Dicarbonsäuren wachsen je näher man zu der am meisten oxydierten Stufe kommt. Also auch hier wieder derselbe Befund wie bei den Versuchen mit einer Säure allein. Nur kommt dieser Effekt hier viel regelmässiger und deutlicher zur Beobachtung. Die einzige Ausnahme bildet der Herzmuskel, indem bei Kombination mit Äpfelsäure mehr CS gebildet wird und auch mit Fumarsäure ungefähr ebenso viel wie mit Oxalessäure. Dieselbe Tatsache kam, wie erwähnt, auch bei

Tabelle Nr. 31.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination verschiedener Substrate (m/100) mit Brenztraubensäure (m/100).*

a) *Leber.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.58 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	1.37	1.95	2.48	0.53	27
Bernsteinsäure ....	0	0.58	0.94	0.36	62
Fumarsäure .....	0	0.58	1.44	0.86	148
l-Äpfelsäure .....	0	0.58	1.49	0.91	180
Oxalessigsäure ....	0.72	1.30	1.60	0.30	23
d,l-Asparaginsäure..	0.12	0.70	1.30	0.60	86

b) *Herzmuskel.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 1.20 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	6.86	8.06	7.06	-1.00	-12
Bernsteinsäure ....	2.40	3.60	10.36	6.76	118
Fumarsäure .....	3.16	4.36	17.94	13.58	311
l-Äpfelsäure .....	3.08	4.28	24.98	21.90	484
Oxalessigsäure ....	2.08	3.28	17.38	14.10	430
d,l-Asparaginsäure..	2.08	3.28	11.54	8.26	252

c) *Nieren.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.80 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	2.20	3.00	4.40	1.40	47
Bernsteinsäure ....	1.80	2.60	4.40	1.80	69
Fumarsäure .....	2.20	3.00	8.10	5.10	170
l-Äpfelsäure .....	2.30	3.10	9.70	6.60	222
Oxalessigsäure ....	4.10	4.90	17.50	13.60	278
d,l-Asparaginsäure..	2.00	2.80	8.80	6.00	214

d) *Skelettmuskel.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.12 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarensäure..	6.60	6.72	7.80	1.08	16
Bernsteinsäure ....	2.00	2.12	2.76	0.64	30
Fumarsäure .....	4.52	4.64	8.12	3.48	75
l-Äpfelsäure .....	5.72	5.84	8.32	2.48	52
Oxalessigsäure ....	7.24	7.36	9.46	2.10	29
d,l-Asparaginsäure..	2.72	2.84	5.20	2.36	83

 e) *Lunge.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 2.10 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarensäure..	0.22	2.32	2.50	0.18	8
Bernsteinsäure ....	0.26	2.38	2.38	0.02	1
Fumarsäure .....	0.72	2.82	3.70	0.88	31
l-Äpfelsäure .....	0.86	2.98	3.86	0.88	29
Oxalessigsäure ....	2.18	4.08	3.94	-0.16	-4
d,l-Asparaginsäure..	0.50	2.60	1.98	-0.62	-24

 f) *Gehirn.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 1.24 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarensäure ..	0.16	1.40	1.04	-0.36	-26
Bernsteinsäure ....	0.68	1.92	3.86	1.76	92
Fumarsäure .....	1.16	2.40	4.32	1.92	80
l-Äpfelsäure .....	1.48	2.72	4.96	2.24	82
Oxalessigsäure ....	3.44	4.68	6.32	1.46	30
d,l-Asparaginsäure..	0.60	1.84	4.96	3.12	170

g) *Testis.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 3.12 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	3.20	6.32	5.12	-1.20	-19
Bernsteinsäure ....	1.72	4.84	6.36	1.52	31
Fumarsäure .....	2.88	6.00	8.00	2.00	33
l-Äpfelsäure .....	1.36	5.48	8.08	2.60	47
Oxalessigsäure ....	4.20	7.32	8.08	0.76	10
d,l-Asparaginsäure..	1.64	4.76	2.48	-2.28	-48

h) *Nebennieren.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 1.80 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	0.70	2.50	3.50	1.00	40
Bernsteinsäure ....	0.80	2.60	5.70	3.10	119
Fumarsäure .....	1.00	2.80	6.80	4.00	143
l-Äpfelsäure .....	1.50	3.30	8.00	4.70	143
Oxalessigsäure ....	3.20	5.00	10.00	5.00	100
d,l-Asparaginsäure..	—	—	—	—	—

i) *Milz.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.46 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure..	2.30	2.76	2.54	-0.22	-8
Bernsteinsäure ....	0.10	0.56	0.54	-0.02	-4
Fumarsäure .....	0.14	0.60	1.14	0.54	94
l-Äpfelsäure .....	0.18	0.64	1.50	0.86	134
Oxalessigsäure ....	0.54	1.00	2.00	1.00	100
d,l-Asparaginsäure..	—	—	—	—	—

j) *Thymus.*

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 1.06 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarensäure..	2.06	3.12	3.16	0.04	1
Bernsteinsäure ....	0.24	1.30	1.44	0.14	10
Fumarsäure .....	0.92	1.98	4.52	2.54	128
l-Äpfelsäure .....	1.20	2.26	5.44	3.18	141
Oxalessigsäure ....	1.94	3.00	6.00	3.00	100
d,l-Asparaginsäure..	—	—	—	—	—

Versuchen mit den Säuren allein zum Vorsehein. Möglicherweise baut der Herzmuskel die Oxalessigsäure so schnell auf irgend einem anderen Weg ab, dass das Gewebe nicht dazukommt aus ihr CS zu bilden.

Die Überlegenheit der  $\alpha$ -Ketoglutarensäure als CS-Bildner im Verhältnis zu den anderen Säuren wird bei den Kombinationsversuchen, besonders was die Bernsteinsäure anbetrifft, stark ausgeglichen. Nur in Leber und Skelettmuskel kommt es bei Kombination mit Brenztraubensäure zu grösserer CS-Bildung als aus Bernsteinsäure. Vergleicht man aber die prozentuale Ausbeute mit dem Summenwert der Versuche der Säuren allein, ist er auch in diesen Geweben für die  $\alpha$ -Ketoglutarensäure kleiner.

Der Kombinationsversuch gibt nur in einigen wenigen Fällen kleinere Werte als wie die Summe der Parallelversuche mit jeder Säure für sich, und zwar bei Versuchen mit  $\alpha$ -Ketoglutarensäure im Herzmuskel, Gehirn und Milz. Aus Asparaginsäure scheint ferner in Lungen und Testis in Gegenwart von Brenztraubensäure nicht soviel CS gebildet zu werden, wie aus jeder Komponente für sich. Sonst ist aber die Stellung der Asparaginsäure im Vergleich zu den 4-C-Dicarbonsäuren dieselbe wie in den Einzelversuchen, nämlich zwischen Bernsteinsäure und Fumarsäure und zwar näher der letzteren.

Die prozentuelle Zunahme gibt selbstverständlich aus ganz natürlichen Gründen nicht immer genauso regelmässig erhöhte Werte. Die durch die verschiedenen Säuren hervorgerufenen CS-Werte werden nämlich meist in den Geweben etwas ausgeglichen.

Es scheint, dass die verschiedenen Gewebe eine verschieden grosse Fähigkeit haben aus Brenztraubensäure und 4-C-Diearbon-

säuren CS zu bilden. Bei Verwendung von Fumarsäure, Äpfelsäure oder Oxalessigsäure in demselben Gewebe kommt man zu annähernd dem gleichen Wertniveau. Die einzige Ausnahme bilden wiederum Herzmuskel und Nieren, der erstere in bezug auf Äpfelsäure und die letztere in bezug auf Oxalessigsäure, da sich deren Werte in diesen Geweben weit über die Höhe der anderen erheben. Vielleicht darf man das gemeinsame Wertniveau als eine Art Masstab für die Fähigkeit der verschiedenen Gewebe CS zu synthetisieren halten. Derart erhält man folgende Reihenfolge, die Verhältniszahlen sind hierbei berechnet aus dem Mittelwert der Versuche mit Fumarsäure, Äpfelsäure und Oxalessigsäure:

Herzmuskel .....	20.1
Nieren .....	11.8
Skelettmuskel .....	8.6
Nebennieren .....	8.3
Testis .....	8.1
Gehirn .....	5.5
Thymus .....	5.3
Lungen .....	3.8
Leber .....	1.5
Milz .....	1.5
Schilddrüse .....	0
Blut .....	0

Besondere Beachtung verdienen die drei ersten Gewebe. Auch in Hinblick auf ihren reichlichen Dehydrasengehalt scheint der CS-Umsatz in ihnen besonders lebhaft zu sein. Die verhältnismässig niedrige Stellung der Leber in dem Verzeichnis lässt sich wohl teilweise durch den starken Gehalt dieses Gewebes an CS abbauenden Enzymen erklären. Man ist geneigt anzunehmen, dass der gesamte CS-Umsatz viel lebhafter in diesem Gewebe ist als wie die Tabelle andeutet.

Der Sicherheit halber wurde ausser den aeroben Bestimmungen auch eine ganze Reihe anaerobe Versuche mit den besten CS-Bildner-Geweben vorgenommen. Sowohl die Werte im Herzmuskel als auch in Nieren entsprechen im Grossen und Ganzen denjenigen der aeroben Versuche, jedoch sind die Werte hier viel kleiner. Das Ergebnis mit  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ist im Verhältnis zu den anderen ziemlich gross und deutet wieder daraufhin, dass die Bildung in Gegenwart von dieser Säure ausser über die 4-C-Dicarbonsäuren auch noch einen anderen Weg verlaufen muss (Tabelle Nr. 32 a und b).

Tabelle Nr 32.

Anaerobe CS-Bildung bei Kombination verschiedener Substrate (m/100) mit Brenztraubensäure (m/100).

a) Herzmuskel.

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.24 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	6.72	6.96	8.32	1.36	20
Bernsteinsäure .....	0	0.24	0.44	0.20	83
Fumarsäure .....	0.52	0.76	2.56	1.80	237
l-Äpfelsäure .....	0.52	0.76	3.40	2.64	348
Oxalessigsäure .....	0.24	0.48	3.22	2.64	550
d,l-Asparaginsäure ..	0.12	0.36	0.40	0.04	11

b) Nieren.

Bei Zusatz von Brenztraubensäure allein 0.28 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	3.64	3.92	3.44	-0.48	-13
Bernsteinsäure .....	0	0.28	0.28	0	0
Fumarsäure .....	0.28	0.56	1.32	0.76	136
l-Äpfelsäure .....	0.36	0.64	1.76	1.12	175
Oxalessigsäure .....	1.40	1.68	2.68	1.00	60
d,l-Asparaginsäure ..	0.08	0.36	0.36	0	0

## 2. Nähere Untersuchung der Kombinationswirkung.

Nachdem klar geworden war, dass in den Gewebeversuchen zweifelsohne eine grössere CS-Bildung zustande kommt bei Zusatz von 4-C-Dicarbonsäuren und Brenztraubensäure zusammen, als wenn beide Komponenten getrennt wirken, war es natürlich von besonderem Interesse den näheren Reaktionsmechanismus bei diesem Vorgang zu untersuchen. Neben die eventuelle direkte Verbindung der beiden Substrate zu einem Komplex, aus dem dann die CS gebildet würde, wie KNOOP und MARTIUS (1936) behaupten, war das Atmungssystem der 4-C-Dicarbonsäuren von v. SZENT-GYÖRGYI und seiner Schule zu stellen. Man könnte ja denken, dass diese nur katalytisch an der Reaktion beteiligt wären. So berichten auch ANNAU (1938) und ANNAU und ERDÖS (1938),



dass sie aus Muskel und Nieren den Aktivator des Enzyms, welches die Oxydation der Brenztraubensäure bewirke, isoliert und als Bernsteinsäure identifiziert hätten und dass die Verbrennung bis zu Essigsäure und Kohlendioxyd verlief.

In den bisher beschriebenen Versuchen wurden immer alle zu untersuchenden Säuren in gleicher Menge zugesetzt (m/100). Es erschien jedoch sehr wahrscheinlich, dass durch Steigerung der einen oder anderen Komponente der Kombinationseffekt verändert würde. In der Tabelle Nr. 33 sind Versuche angeführt mit Herzmuskel, Nieren und Gehirn, bei welchen die zugegebene Gesamt-

Tabelle Nr. 33.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination von Brenztraubensäure mit Substraten in verschiedenen Mengenverhältnissen. CS in mg.*

Gewebe	Substrat	m-Brenztraubensäure : m-Substrat (Summe = m/100)					
		5 : 0	4 : 1	3 : 2	2 : 3	1 : 4	0 : 5
Herzmuskel	Fumarsäure .....	2.2	5.8	12.6	19.8	15.2	2.9
„	l-Äpfelsäure .....	2.2	7.1	14.4	12.7	9.3	4.2
„	Oxalessigsäure .....	1.2	4.0	7.4	10.2	15.1	1.2
Nieren	$\alpha$ -Ketoglutarsäure ....	1.6	1.6	2.1	2.1	1.7	1.5
„	Bernsteinsäure .....	1.7	3.3	3.5	4.4	3.6	0.3
„	Fumarsäure .....	0.9	7.1	7.9	8.1	4.8	0.2
„	l-Äpfelsäure .....	1.4	11.0	6.7	4.0	2.1	0.8
„	Oxalessigsäure .....	1.2	9.9	8.0	6.8	5.0	2.8
Gehirn	Fumarsäure .....	2.2	3.8	3.6	3.2	2.3	0.8
„	l-Äpfelsäure .....	2.2	4.8	3.8	3.8	4.1	0.8
„	Oxalessigsäure .....	2.8	3.8	3.8	4.0	4.3	3.0
„	Oxalessigsäure .....	2.0	3.7	3.7	4.5	3.0	2.1

menge der Moleküle immer gleich war (m/100), während das Verhältnis zwischen den beiden zugesetzten Säuren variiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, wie erwartet, dass nicht in allen Fällen genauso viel CS gebildet wird. Ferner verhalten sich auch die verschiedenen Gewebe hier nicht gleich. Im Herzmuskel sind besonders viel 4-C-Dicarbonsäuren nötig und von diesen am aller meisten Oxalessigsäure, um zusammen mit Brenztraubensäure aus derselben Molekülmenge eine optimale CS-Bildung zu erhalten. Mit Äpfelsäure wird das Maximum mit einer im Verhältnis kleineren Menge erreicht. Wie schon im Vorhergehenden berichtet wurde, entstand ja aus Äpfelsäure allein oder zusammen mit Brenztrauben-

säure verglichen mit den anderen 4-C-Dicarbonsäuren am meisten CS im Herzmuskel.

Im Nierengewebe, in welchem, genau wie in den anderen untersuchten Geweben, die Oxalessigsäure anstatt der Äpfelsäure die höchsten Werte gibt, braucht man im Vergleich zur Brenztraubensäure nur wenig 4-C-Dicarbonsäuren, vor allem besonders wenig Oxalessigsäure, zur Erreichung des Maximums. Die früheren Oxydationsstadien, wie die Fumarsäure, Bernsteinsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure sind dagegen in grösseren Mengen zuzusetzen.

Im Gehirn scheint sich das Verhältnis wieder mehr dem Herzmuskel zu nähern. Der Kombinationseffekt ist hier aber im Vergleich zu der Wirkung der einzelnen Säuren recht gering.

Trotz der bei den verschiedenen Geweben schwankenden Werte scheint es schwerlich möglich, dass die 4-C-Dicarbonsäuren nur katalytisch auf den Vorgang einwirken. Wäre dies der Fall müsste ja der Zusatz fast einer jeden Säure, und zwar in ganz kleinen Mengen, ausreichen um eine starke CS-Bildung hervorzurufen. Besonders aber im Herzmuskel bedarf es jener in grösseren Mengen als der Brenztraubensäure. Die Ergebnisse im Nierengewebe könnten dagegen schon eher auf diese Art erklärt werden.

Um Klarheit in dieser Frage zu erhalten wurden Versuche

Tabelle Nr. 34.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination derselben Brenztraubensäuremenge (m/100) mit wachsenden Substratquantitäten. CS in mg (Probe mit Brenztraubensäure allein, von den Werten abgezogen).*

Gewebe	Substrat	Zugesetzte Substratmenge in mg						
		0.5	0,7	1.0	3.0	5.0	10.0	25.0
Herzmuskel	$\alpha$ -Ketoglutarsäure	0	0	0	0	0	—	—
„	Bernsteinsäure ..	0.08	0.20	0.62	0.76	0.92	—	—
„	Fumarsäure .....	0.41	0.65	0.89	3.36	3.33	—	—
„	l-Äpfelsäure .....	0.27	0.50	0.72	2.39	—	—	—
„	„ .....	—	—	0.74	—	2.85	7.21	—
„	Oxalessigsäure ..	0.32	—	1.00	1.24	2.20	—	—
„	d,l-Asparaginsäure	0	—	0.28	0.56	1.08	—	—
Nieren	Fumarsäure .....	—	—	—	0	4.00	9.00	9.56
„	„ .....	0.72	0.93	1.04	2.78	—	—	—
„	l-Äpfelsäure .....	—	—	—	—	5.80	11.40	14.70
„	„ .....	0.50	0.80	1.00	—	2.20	—	—
„	„ .....	0.10	0.80	1.40	2.60	—	—	—
Gehirn	Oxalessigsäure ..	0.16	—	0.32	1.88	—	—	—

ausgeführt, bei denen einerseits die Brenztraubensäure konstant gehalten und die verschiedenen 4-C-Dicarbonsäuren in steigenden Mengen zugesetzt wurden oder andererseits zu konstanter Quantität der 4-C-Dicarbonsäuren wachsende Brenztraubensäurekonzentrationen hinzugegeben wurden.

Die Tabelle Nr. 34 zeigt, dass bei Zusatz kleiner Mengen 4-C-Dicarbonsäuren die Bildung aus Brenztraubensäure schnell beschleunigt wird. Im Herzmuskel und besonders in den Nieren erhält man in einigen Fällen höhere Werte als wie von der betreffenden Säure zugesetzt wurde. Bei Zusatz grösserer Mengen von 4-C-Dicarbonsäuren ist die Zunahme der CS-Bildung nicht mehr ebenso stark. Die Tatsache, dass die CS-Bildung bei diesen Versuchen mehr zunimmt als wie von der betreffenden 4-C-Dicarbonsäure vorhanden ist, scheint für die katalytische Wirkung derselben zu sprechen. Jedoch wird hierdurch auch nicht die Möglichkeit ausgeschaltet, dass die beiden Säuren direkt miteinander reagieren. In diesem Fall kann nämlich mehr CS gebildet werden als wie Säure zugesetzt wird. Rechnen wir z. B., dass nur ein Molekül Brenztraubensäure mit einem Molekül der 4-C-Dicarbonsäure unter Bildung des Komplexes reagiert, bekommen wir für Äpfelsäure folgende Mengen CS:

0.3 mg Äpfelsäure .....	0.43 mg CS
0.5 » » .....	0.72 » »
1.0 » » .....	1.43 » »
3.0 » » .....	4.30 » »
5.0 » » .....	7.20 » »
10.0 » » .....	14.30 » »

Brenztraubensäure ist in jedem Versuch in genügender Menge vorhanden. Vergleichen wir die durch die 4-C-Dicarbonsäuren verursachten Zunahmen der CS mit den berechneten Werten sehen wir deutlich, dass die ersteren regelmässig kleiner sind.

Gegen die katalytische Wirkung der 4-C-Dicarbonsäuren sprechen ferner die Resultate der Versuche mit Herzmuskel, bei denen, im Gegensatz zu den im Vorhergehenden erläuterten, die Brenztraubensäure in steigenden Mengen zugesetzt wurde. Hier könnte man nämlich (Tabelle Nr. 35) mit noch grösserer Berechtigung annehmen, dass die Brenztraubensäure ihrerseits die Bildung von CS aus Fumarsäure oder Äpfelsäure katalytisch beschleunige. Berechnet man ebenso wie oben die der Brenztraubensäure entsprechenden CS-Werte, kommt man auch hier zur selben Schlussfolgerung. Die Hauptsache ist, dass mehr CS gebildet wird als wie Brenztraubensäure zugesetzt wurde, d. h. mit anderen Worten,

Tabelle Nr. 35.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination konstanter Substratquantitäten (m/100) mit wachsenden Brenztraubensäuremengen. CS in mg (Probe mit Substrat allein, von den Werten abgezogen).*

Gewebe	Substrat	Zugesetzte Brenztraubensäuremenge in mg				
		0.5	1.0	3.0	5.0	10.0
Herzmuskel	Fumarsäure .....	0.16	1.68	2.16	5.26	—
	l-Äpfelsäure .....	0.88	1.84	2.96	5.44	6.00
	Oxalessigsäure .....	0.40	0.88	1.36	4.48	—
Nieren	Fumarsäure .....	0	0.15	0.75	0.83	—
	l-Äpfelsäure .....	0	0.28	0.86	1.20	—

dass auch die Äpfelsäure an dem Vorgang als Baustoff der CS beteiligt sein muss.

0.5 mg Brenztraubensäure .....	1.10 mg CS
1.0 » » .....	2.20 » »
3.0 » » .....	6.60 » »
5.0 » » .....	11.00 » »
10.0 » » .....	22.00 » »

Im Nierengewebe ruft der Zusatz von Brenztraubensäure bei weitem nicht eine so grosse Zunahme der CS-Bildung hervor. Es handelt sich hier um dieselbe Erscheinung, die bei den Versuchen beobachtet wurde, bei welchen die Molekülsumme konstant gehalten und das Verhältnis zwischen den kombinierten Substraten variiert wurde. Der Herzmuskel braucht viel 4-C-Dicarbonsäuren und die Nieren wiederum viel Brenztraubensäure zur grösst möglichen CS-Bildung. Vielleicht kann dieses unterschiedliche Verhalten durch verschiedene Abbauwege der Säuren in den Geweben oder durch sonstige verschiedene Umsatzvorgänge derselben erklärt werden.

Nachdem geklärt war, bei welchen Bedingungen und in welchem Verhältnis die Säuren zugesetzt werden mussten zur Erreichung eines möglichst guten Bildungseffekts, schien es von Interesse festzustellen, wieviel CS die besten Gewebe in Gegenwart genügender Substratmengen bilden können. Da aber auch konstatiert worden war, dass verhältnismässig kleine Mengen eine verhältnismässig grössere Ausbeute geben, wurden die Versuche in Serien angestellt, wobei die betreffenden Säuren in einem bestimmten Verhältnis in steigenden Mengen zugesetzt wurden. Im Gegensatz zu den früheren Versuchen wurde ferner während der ganzen Versuchsdauer Sauerstoff durch die Suspension geleitet (Tabelle 36).

## Optimale CS-Bildung bei Kombinationsversuchen von

Gewebe	Substrat	m-Brenztr.: m-Substrat	Summe der zugesetzten					
			50		10.0		20.0	
			I <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	I	II	I	II
Herzmuskel ..	Oxalessigsäure	1:4	—	—	—	—	3.5	17
„ ..	l-Äpfelsäure	2:3	—	—	—	—	10.9	54
„ ..	„	2:3	—	—	—	—	—	—
„ ..	„	2:3	—	—	—	—	—	—
„ ..	„	2:3	—	—	—	—	—	—
Nieren .....	„	4:1	1.6	31	4.8	48	9.8	49
„ .....	„	4:1	—	—	5.2	52	9.8	49
„ .....	„	4:1	—	—	—	—	—	—

<sup>1</sup> Gebildete CS in mg.

<sup>2</sup> Gebildete CS in % der zugesetzten Säuren.

Bei Durchsicht der Ergebnisse ist festzustellen, dass die CS-Bildung bei zunehmender Substratmenge bis zu einer gewissen Grenze ansteigt, wonach die Ausbeute wieder anfängt kleiner zu werden bis die Bildung zuletzt vollkommen aufhört. Die grösste prozentuelle Ausbeute im Herzmuskel aus Äpfelsäure und Brenztraubensäure beläuft sich auf 69 %. Die höchste von derselben Gewebsmenge gebildete Quantität war 166.3 mg. Berücksichtigt man, dass bei den Versuchen 20 g Gewebsbrei und 50 cm<sup>3</sup> Pufferlösung verwendet wurden, so hat der Herzmuskel eine 0.225 % CS-Lösung gebildet oder mit anderen Worten kann 1 g Gewebe 0.0084 g CS synthetisieren, d. h. 0.84 % seines Gewichts.

Schon vorher wurde gezeigt, dass im gekochten Gewebe keine CS gebildet wird. Die hier beschriebenen Versuche müssen auch die letzten Zweifel darüber, ob die CS-Bildung eine enzymatische Reaktion ist, zerstreuen, denn die Bildung nimmt nur so lange zu, als die Vorläufer nicht über eine bestimmte Giftgrenze hinaus zugegen sind. Würde es sich nur um eine rein chemische Reaktion handeln, nähme die CS-Bildung nicht ab sondern würde im Gegenteil andauernd zunehmen.

Ferner bestätigen diese Versuche die Teilnahme beider Säuren an der CS-Synthese. Vergleichen wir nämlich z. B. die vom Herzmuskel gebildete CS-Menge mit der, die theoretisch aus Brenztraubensäure entstehen könnte, falls diese vollkommen zu CS

## Nr. 36.

*Brenztraubensäure mit Oxalessäure und l-Äpfelsäure.*

Säuren in mg													
40.0		80.0		160.0		320.0		640.0		960.0		1280.0	
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
7.8	19	19.0	24	28.8	18	58.4	18	112.0	17.5	—	—	2.5	0.2
23.5	60	40.0	50	72.0	45	110.0	34	151.0	24	—	—	3.1	0.3
27.6	69	47.5	59	61.8	39	82.8	26	95.0	15	91.3	9	2.5	0.2
26.4	66	46.1	58	62.7	40	133.0	42	135.4	21	—	—	—	—
20.7	52	40.4	50	54.2	34	96.9	30	166.3	26	—	—	—	—
13.7	36	17.9	22	24.0	15	26.4	8	—	—	—	—	—	—
15.6	39	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	10.9	14	19.7	12	29.5	9	52.7	8.5	51.3	6	—	—

umgesetzt würde bei einbar katalytischer Wirkung der Äpfelsäure, so kommen wir zu folgendem, den früheren Versuchen entsprechendem Resultat:

Zugesetzte Brenztraubensäure	Gebildete CS (Vgl. Tabelle Nr. 36)				
14.4 mg	23.5	27.6	26.4	20.7 mg	
28.8 »	40.0	47.5	46.1	40.4 »	
57.6 »	72.0	61.8	62.7	54.2 »	
115.2 »	110.0	82.8	133.0	96.0 »	
330.4 »	151.0	95.0	135.4	166.3 »	

Bei Zusatz von Brenztraubensäure in steigender Menge wird also mehr CS gebildet als wie der zugesetzten Menge entspricht. Der Unterschied muss daher durch Äpfelsäure bedingt sein. In bezug auf die Äpfelsäure kann man genau dasselbe nachweisen und zwar am besten mit in Nierengewebe vorgenommenen Versuchsserien.

Um eine Vergiftung der CS abbauenden Enzyme kann es sich meines Erachtens auch nicht handeln, denn es lässt sich kaum erklären, woher das Gewebe die Baustoffe für eine so starke CS-Bildung bekäme.

Die zuletzt besprochenen Versuche wurden insofern abweichend von den früheren ausgeführt, als durch die Gewebesuspension andauernd Sauerstoff geleitet wurde, welches Vorgehen schon bei den orientierenden Versuchen eine weitere Zunahme der CS-Bildung bewirkte. Tabelle Nr. 37 zeigt, dass dies tatsächlich der Fall ist. In diesen mit Herzmuskel vorgenommenen Versuchs-

Tabelle Nr. 37.

Die Wirkung der Sauerstoffeinleitung auf CS-Auf- und Abbau im Herzmuskel.  
CS in mg.

Substrat	O <sub>2</sub> -Einleitung	Bebrütungszeit in Min.					
		0	15	30	45	75	135
75 mg 1-Äpfel- + 50 mg Brenztraubensäure	15 Min. ....	0	24.8	27.5	29.8	28.8	24.4
	während der ganzen Versuchsdauer ....	0	28.0	38.0	39.2	38.6	38.0
50 mg CS	15 Min. ....	50.0	39.8	—	34.5	28.0	20.0
	während der ganzen Versuchsdauer ....	50.0	39.8	—	32.0	26.0	17.0

serien wurde die in der Zeiteinheit geschehende CS-Bildung, ebenso wie der Abbau derselben verfolgt. Bei beiden Vorgängen ist die Enzymaktivität grösser in Gegenwart von Sauerstoff, wenn auch beim Abbau der Unterschied nicht so gross ist. Vergleichen wir die in den Kombinationsversuchen in den aufeinander folgenden Zeiteinheiten gebildete CS mit den früheren Versuchen mit einzelnen Säuren (vgl. Seite 41) ist augenscheinlich, dass bei den ersteren nach 30 Minuten nicht eine so jähe Abnahme der CS eintritt, die bei den früheren Versuchen durch die Wirkung der abbauenden Enzyme erklärt wurde. Es ist ohne weiteres klar, dass die abbauenden Enzyme auch jetzt vorhanden sind, aber es sind auch beide zur Synthese notwendigen Säuren in genügender Menge für eine fortgesetzte CS-Bildung zugegen, während in den früheren Versuchen die CS-Abnahme wahrscheinlich sofort dann einsetzte, wenn das Gewebe nicht mehr die zweite zur Synthese notwendige Komponente mobilisieren konnte.

### 3. Die Wirkung der Gifte bei den Kombinationsversuchen.

Ebenso wie die früheren Vergiftungsversuche wurden auch diese mit Nierengewebe vorgenommen. Als Substrat wurde nur Äpfelsäure und Brenztraubensäure verwendet, da die Wirkung der Gifte, was die verschiedenen 4-C-Dicarbonsäuren anbetrifft, keine grösseren Unterschiede aufwies. Ferner wurden die Gifte in Mengen zugesetzt, die sich bei den früheren Versuchen als effektiv erwiesen hatten.

Tabelle Nr. 38.

Der Einfluss von Gewebsgiften auf die aerobe CS-Bildung im Herzmuskel bei Kombination von Brenztraubensäure (m/100) mit l-Äpfelsäure (m/100).

G i f t	Zugesetzte Giftmenge	G e b i l d e t e C S		
		Ohne Gift	Mit Gift	
			in mg (= 100 %)	in mg
Na-arsenit . . . . .	m/500	19.4	0	0
„ . . . . .	„	10.7	0	0
„ . . . . .	„	15.0	0	0
Na-cyanid . . . . .	m/500	10.7	5.1	48
„ . . . . .	„	15.0	5.3	35
Na-fluorid . . . . .	m/100	10.7	8.8	84
„ . . . . .	m/50	10.7	10.7	100
Toluol . . . . .	10 cm <sup>3</sup>	13.2	5.7	43
„ . . . . .	„	10.7	4.1	38
„ . . . . .	„	15.0	5.0	33
Na-malonat . . . . .	m/50	13.2	13.8	105
„ . . . . .	m/100	10.5	8.7	83
„ . . . . .	„	10.7	10.7	100
„ . . . . .	„	15.0	15.6	103

Ebenso wie bei den Versuchen mit einzelnen Säuren hemmt die Arsenigsäure die CS-Bildung auch bei den Kombinationsversuchen (Tabelle Nr. 38). Auch Cyanid und Toluol wirken hindernd, wenn auch nicht so stark wie die Arsenigsäure. Fluorid hat dagegen fast keine Wirkung.

Am interessantesten waren die Versuche mit Malonsäure, welche, wie früher dargelegt wurde, die CS-Bildung bei Zusatz von Brenztraubensäure hemmt, die Bildung aus 4-C-Dicarbonsäuren dagegen eher beschleunigt. Bei Zusatz von Malonsäure zu den Kombinationsversuchen war kein deutlicher Unterschied in der CS-Bildung in der einen oder anderen Richtung festzustellen. BANGA (1936) erklärte, dass die Malonsäure die Funktion des Atmungssystems bremse, indem sie die Umsetzung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure hemme; wenn von der letzteren zu dem Atmungssystem hinzugesetzt würde, würde die Atmung gleichsam konserviert. Bei meinen Versuchen kann es sich aber nicht nur um eine Vergiftung des erwähnten Systems handeln, sondern muss eine Hemmung der CS-Bildung aus Brenztraubensäure bei Reaktion derselben mit 4-C-Dicarbonsäuren vorliegen, unabhängig davon, ob der Prozess mit der Gewebsatmung verknüpft ist oder nicht.



*Zusammenfassung:* In allen untersuchten Geweben wird aus Brenztraubensäure zusammen mit 4-C-Dicarbonsäuren mehr CS gebildet als aus beiden Säuren getrennt. Abgesehen von einigen Ausnahmen nimmt die CS-Bildung mit dem Oxydationsgrad der 4-C-Dicarbonsäuren zu, jedoch so, dass die Fumarsäure, l-Äpfelsäure und Oxalessigsäure zuletzt eine fast ebenso grosse Synthese bewirken. Eine Ausnahme bildet die l-Äpfelsäure im Herzmuskel, aus ihr wird viel mehr CS gebildet als aus den anderen. Auf Grund der angestellten Versuche kann man die Gewebe in bezug auf ihre Fähigkeit CS zu bilden in folgende Reihenfolge ordnen: Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel, Nebennieren, Testis, Gehirn, Thymus, Lungen, Leber, Milz und Schilddrüse und Blut, in welchen beiden letzteren überhaupt keine CS entsteht.

Beim Vergleich der Versuche nach Zusatz verschieden grosser Säuremengen miteinander kommt man zu dem Ergebnis, dass es sich weder um die katalytische Wirkung der 4-C-Dicarbonsäuren noch der Brenztraubensäure handeln kann, sondern, dass die Säuren tatsächlich zusammen reagieren müssen. Bei günstigen Bedingungen wird nämlich mehr CS gebildet als wie von dem einen Substrat zu der Suspension hinzugegeben wurde.

Die grösste CS-Menge, die das in dieser Hinsicht beste Gewebe, der Herzmuskel bei optimalen Bedingungen bilden kann, war in meinen Versuchen 0.84 % des Gewichts oder eine 0.225 % Lösung.

Die Gifte wirken in den Kombinationsversuchen genau wie in den Versuchen mit einer Säure allein. — Die l-Äpfelsäure hebt die hemmende Wirkung der Malonsäure auf die CS-Bildung aus Brenztraubensäure auf.

### c. *$\beta$ -Oxybuttersäure und 4-C-Dicarbonsäuren.*

Bei den orientierenden Versuchen mit Nierengewebe gab die  $\beta$ -Oxybuttersäure viel schlechtere Resultate als die Brenztraubensäure. In Tabelle Nr. 39 a—f sind die entsprechenden Ergebnisse für Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel, Gehirn, Testis und Nebennieren zusammengestellt.

Am deutlichsten ist die CS-Bildung ausser im Nierengewebe in Herz- und Skelettmuskel, in welchen beiden Geweben nach Zusatz von nur  $\beta$ -Oxybuttersäure gar keine Synthese stattfand. Auch die Nebennieren gaben einigermaßen positive Werte, dagegen waren die Versuche mit Gehirn und Testis ganz oder so gut wie negativ, abgesehen von den Kombinationsversuchen mit Oxalessigsäure.

Was die verschiedenen Säuren anbetrifft, wächst die CS-Bildung

Tabelle Nr. 39.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination verschiedener Substrate (m/100) mit  $\beta$ -Oxybuttersäure (m/100).*

 a) *Herzmuskel.*

Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0.04 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	5.92	5.96	7.48	1.52	26
Bernsteinsäure ....	0.78	0.82	1.76	0.74	90
Fumarsäure .....	1.88	1.92	3.56	1.64	86
l-Äpfelsäure .....	2.20	2.24	4.20	1.96	87
Oxalessigsäure ....	1.96	2.00	1.80	-0.20	-10
d,l-Asparaginsäure ..	0.40	0.44	1.20	0.76	173

 b) *Nieren.*

Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0.60 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	3.10	3.70	5.10	1.40	38
Bernsteinsäure ....	0.20	0.80	1.60	0.80	100
Fumarsäure .....	1.30	1.90	3.80	1.90	100
l-Äpfelsäure .....	1.50	2.10	4.40	2.30	110
Oxalessigsäure ....	3.00	3.60	9.98	6.38	177
d,l-Asparaginsäure ..	1.34	1.94	1.70	-0.24	-12

 c) *Skelettmuskel.*

Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	9.36	9.36	8.32	-1.04	-11
Bernsteinsäure ....	1.40	1.40	2.48	1.08	77
Fumarsäure .....	3.36	3.36	5.76	2.40	71
l-Äpfelsäure .....	4.16	4.16	7.44	3.28	79
Oxalessigsäure ....	6.00	6.00	8.00	2.00	33
d,l-Asparaginsäure ..	—	—	—	—	—

d) *Gehirn.*Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0.64 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	0.28	0.92	0.76	-0.16	-17
Bernsteinsäure ....	0.38	1.02	0.80	-0.22	-22
Fumarsäure .....	0.80	1.44	1.20	-0.24	-19
l-Äpfelsäure .....	1.08	1.72	1.38	-7.34	-20
Oxalessigsäure ....	3.72	4.36	5.96	2.30	53
d,l-Asparaginsäure..	0.62	1.26	0.68	-0.58	-46

e) *Testis.*Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0.52 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	2.40	2.92	2.92	0	0
Bernsteinsäure ....	1.04	1.56	1.40	-0.16	-10
Fumarsäure .....	2.04	2.64	2.32	-0.18	-7
l-Äpfelsäure .....	2.12	2.64	3.52	0.88	33
Oxalessigsäure ....	4.00	4.52	5.52	1.00	22
d,l-Asparaginsäure..	—	—	—	—	—

f) *Nebennieren.*Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure allein 0.10 mg CS.

Substrat	Gebildete CS in mg			Zunahme	
	Substrat allein	Berechnete Summe	Kombinationsversuch	in mg	in %
$\alpha$ -Ketoglutarsäure ..	—	—	—	—	—
Bernsteinsäure ....	0.20	0.10	0.26	0.16	160
Fumarsäure .....	0.84	0.94	1.54	0.60	64
l-Äpfelsäure .....	0.96	1.06	1.70	0.66	62
Oxalessigsäure ....	—	—	—	—	—
d,l-Asparaginsäure..	—	—	—	—	—

wiederum mit dem Oxydationsgrad der 4-C-Dicarbonsäuren, jedoch auch hier verhält sich das Herzmuskelgewebe abweichend von den anderen, indem die Oxalessigsäure darin schwächer wirkt als die Äpfelsäure und Fumarsäure. Die Ergebnisse entsprechen also vollkommen den Versuchen mit Brenztraubensäure.

Berücksichtigt man einerseits das Verhalten der Brenztraubensäure andererseits das der  $\beta$ -Oxybuttersäure sowohl bei alleiniger Verwendung als auch bei Kombination mit 4-C-Dicarbonsäuren nach Vergiftung mit Malonsäure (Tabelle Nr. 40), scheint es sehr wahrscheinlich, dass die CS-Synthese in beiden Fällen denselben Weg verläuft. Da aus Brenztraubensäure in allen Versuchen viel mehr CS entsteht, ist anzunehmen, dass die  $\beta$ -Oxybuttersäure zuerst zu Brenztraubensäure umgesetzt wird.

Tabelle Nr. 40.

Die Wirkung von Malonsäure (Na) auf die aerobe CS-Bildung im Nierengewebe bei Kombination von  $\beta$ -Oxybuttersäure (m/100) mit l-Äpfelsäure (m/100).

Zugesetzte Malonsäuremenge	Gebildete CS		
	Ohne Malonsäure in mg (= 100 %)	Mit Malonsäure	
		in mg	in %
m/50 .....	5.48	4.98	91
' .....	6.40	6.40	100
' .....	6.00	5.90	98
m/100 .....	4.42	4.84	109
' .....	7.54	7.85	103
' .....	6.00	6.10	102

Dass der Anteil der 4-C-Dicarbonsäuren bei der CS-Synthese nach Zugabe von  $\beta$ -Oxybuttersäure nicht nur katalytisch sein kann, beweisen die in Tabelle Nr. 41 mit Nierengewebe vorgenommenen Versuche, in welchen die Säuren in verschiedenen Verhältnissen zugesetzt wurden. Zur Erhaltung einer möglichst grossen CS-Ausbeute bedarf es verhältnismässig grosser Mengen beider Substrate; dies besonders bei Kombination mit Äpfelsäure als 4-C-Dicarbonsäure. Bei einem katalytischen Vorgang müsste jedoch, wie bereits erwähnt, eine ganz kleine Quantität derselben ausreichen.

*Zusammenfassung:* Bei Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure kombiniert mit 4-C-Dicarbonsäuren entsteht in Nieren, Herzmuskel, Skelettmuskel und Nebennieren deutlich mehr CS als aus jeder

Tabelle Nr. 41.

*Aerobe CS-Bildung im Nierengewebe bei Kombination von  $\beta$ -Oxybuttersäure mit Substraten in verschiedenen Mengenverhältnissen. CS in mg.*

Substrat	m- $\beta$ -Oxybuttersäure: m-Substrat (Summe m/100)					
	5:0	4:1	3:2	2:3	1:4	0:5
Fumarsäure .....	0.5	2.2	3.4	3.0	2.8	0.6
„ .....	1.0	1.0	2.3	1.9	1.8	0.6
l-Äpfelsäure .....	0.5	1.3	1.5	3.1	3.9	0.6
„ .....	1.0	1.7	1.9	2.3	2.5	0.6
Oxallessigsäure .....	0.5	2.8	3.8	4.6	4.6	2.0

Säure getrennt. In Testis und Gehirn kommt dieser Effekt nicht so deutlich zum Vorschein. Bei Kombination der 4-C-Dicarbonsäuren mit  $\beta$ -Oxybuttersäure in verschiedenen Verhältnissen, aber konstanter m-Summe der Substrate, erhält man die höchsten CS-Werte für die einzelnen Säuren bei ganz verschiedenen Mengenverhältnissen. Malonsäure hemmt nicht die CS-Bildung, wie es der Fall war bei Versuchen mit jeder der Säuren allein.

#### d. Essigsäure und 4-C-Dicarbonsäuren.

Die dritte Kombinationsmöglichkeit bestand zwischen der Essigsäure und 4-C-Dicarbonsäuren, wenn man die positiven Ergebnisse mit Milchsäure als über Brenztraubensäure verlaufend hier weglässt. Essigsäure allein erwies sich in meinen Versuchen im Gegensatz zur Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure nicht als CS-Bildner.

Tabelle Nr. 42.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination von Essigsäure mit Oxallessigsäure in verschiedenen Mengenverhältnissen. CS in mg.*

Gewebe	m-Essigsäure: m-Oxallessigsäure (Summe m/50)					
	5:0	4:1	3:2	2:3	1:4	0:5
Herzmuskel .....	0	1.2	2.2	2.7	3.8	3.5
Nieren.....	0	1.6	2.0	2.8	3.0	3.6
Skelettmuskel .....	0	1.6	1.8	2.4	2.7	2.9
Gehirn.....	0	0.8	1.4	1.9	2.3	3.0
Testis .....	0	2.0	3.2	4.4	4.9	5.2

Schon früher wurden in einer vorläufigen Mitteilung Resultate meiner Untersuchungen (HALLMAN, 1939) mitgeteilt, welche auf eine Vergrößerung der CS-Bildung bei Zusatz von 4-C-Diearbonsäuren durch Essigsäure schliessen liessen. Tabelle Nr. 42 zeigt jedoch, dass ausser diesen Versuchen mit Herzmuskel keine positiven Resultate erhalten wurden. Auch von neuem vorgenommenen Versuchsserien mit Herzmuskel führten zu demselben Resultat, jedoch war die CS-Ausbeute nie auch nur annähernd mit der bei Versuchen mit Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure erhaltenen zu vergleichen.

*Zusammenfassung:* Bei Kombinationsversuchen mit Essigsäure und 4-C-Diearbonsäuren erhält man in allen Geweben mit Ausnahme des Herzmuskels ebenso grosse Werte wie mit den 4-C-Diearbonsäuren allein. Auch im Herzmuskel ist die Zunahme der CS-Bildung bei Kombinationsversuchen ziemlich gering im Vergleich zu den Versuchen mit Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure.

#### 4. Vergleichsversuche mit der enzymchemischen Citronensäurebestimmungsmethode von THUNBERG.

Im Zusammenhang mit der Methodik wurde schon über Versuche berichtet, die zeigten, dass die mit der Pentabromacetonreaktion erhaltenen Ergebnisse nicht durch die bei den synthetischen Versuchen zugesetzten Substrat-Säuren bedingt werden. Ein eventueller Fehler, der durch die Reaktion einiger Verbindungen bei der CS-Bestimmung hätte entstehen können, wurde durch Vornahme von Parallelversuchen ausgeschaltet. Ebenso wurde die Möglichkeit, dass das Gewebe als solches irgendwie katalytisch eine CS-Bildung bewirkt, wiederlegt.

Die einzige Fehlerquelle wäre demnach, wenn die Pentabromacetonmethode nicht spezifisch genug für CS sei. Die nächsten Abbauprodukte der CS, die cis-Aconitsäure und die iso-Citronensäure geben nicht die Pentabromacetonreaktion, wie schon im Zusammenhang mit der Methodik erwähnt wurde. Falls die CS-Reaktion nicht spezifisch wäre, müsste es sich also um eine bisher wohl unbekannte Verbindung handeln. Die enzymchemische THUNBERG-Methodik, die ja bekanntlich sehr viel zu CS-Bestimmungen verwendet worden ist, obgleich dabei auch die iso-CS bestimmt wird, dürfte grössere Sicherheit geben als die Pentabromacetonreaktion allein, dass es sich tatsächlich um CS handelt. Jedenfalls kommt bei dieser Methode keine dem Organismus völlig fremde Verbindung in Frage.

In meiner Absicht lag es nicht mit diesen beiden Methoden in Gewebesuspensionen völlig übereinstimmende Werte zu ermitteln. Die Bestimmungen wurden auf möglichst einfache Art direkt aus den Suspensionen ausgeführt. Die Hauptsache war es mir mit der THUNBERG-Methodik nachzuweisen, dass tatsächlich eine CS-Bildung stattfindet.

In diesem Zusammenhange ist es nicht am Platze die Ausführung der CS-Bestimmung nach THUNBERG näher zu erläutern (vgl. THUNBERG 1933). — Die Berechnung wurde durch Vergleich mit der Standartkurve nach THUNBERG bewerkstelligt.

Die Versuche wurden auf gewöhnliche Art ausgeführt, jedoch wurde der Abbruch des Versuchs nach genügend langer Bebrütungsdauer und gleichzeitig die Ausfällung der Eiweisskörper durch 15 Minuten langes Kochen der Suspensionen bewirkt. Dieses Vorgehen war deswegen notwendig, da der Zusatz von Trichloressigsäure die Ausführung der enzymatischen Bestimmung aus dem Filtrat unmöglich macht. Für die Pentabromacetonreaktion wurde dann aus einem Teil des Filtrats das Eiweiss endgültig durch Zusatz von Trichloressigsäure entfernt. Ein anderer Teil des Filtrats wurde wiederum direkt zur Thunbergbestimmung verwendet.

Zu diesen Kontrollversuchen wurden solche Gewebe gewählt, in denen die CS-Bildung relativ stark ist, wie z. B. Herzmuskel und Nieren. Auch wurden als Baustoffe der CS nur besonders geeignete Substrate genommen. Ausser Versuchen mit I-Äpfelsäure, Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketoglutar-säure wurde die CS-Bildung nach Zusatz von  $\beta$ -Oxybuttersäure mit besonderem Interesse verfolgt, da das Verhalten dieser Säure bei der Pentabromacetonmethode etwas unsicher erschien.

Zur Ausschaltung aller möglichen Fehler wurde die Standartkurve, welche durch Verwendung bekannter CS-Lösungen erhalten wurde, aufgestellt, indem jedesmal ausser der CS die betreffenden Säuren zugesetzt wurden. Ferner wurde die O-Probe nach Zusatz der betreffenden Säuren und auch der CS, aber erst nach Ausfällung des Eiweiss, mit einer entsprechenden Standartkurve verglichen. Auf diese Art wird die eventuelle Wirkung der Spontandonatoren der Suspension, ebenso wie die der verwendeten Säuren, ausgeschaltet. — Durch Vergleich der erhaltenen Standartkurve und der Kurve des eigentlichen synthetischen Versuchs mit derjenigen der CS-Wasserlösung erhält man ein Bild über die tatsächliche Zunahme der CS durch Bildung bei Zusatz der Vorläufer. — Abb. Nr. 14—15 zeigen, dass die erhaltenen Kurven ganz den ihnen zu stellenden Forderungen entsprechen.

Abgesehen von einigen Ausnahmen geben die mit der THUNBERG-Methodik vorgenommenen Bestimmungen höhere Werte (Tabelle Nr. 43). Schon die Wasserprobe (Nr. 1) zeigt dies. Vergleicht man hiermit die Bestimmung aus derselben Suspension, in welcher aber das Eiweiss zuerst durch Kochen koaguliert wurde (Nr. 2),

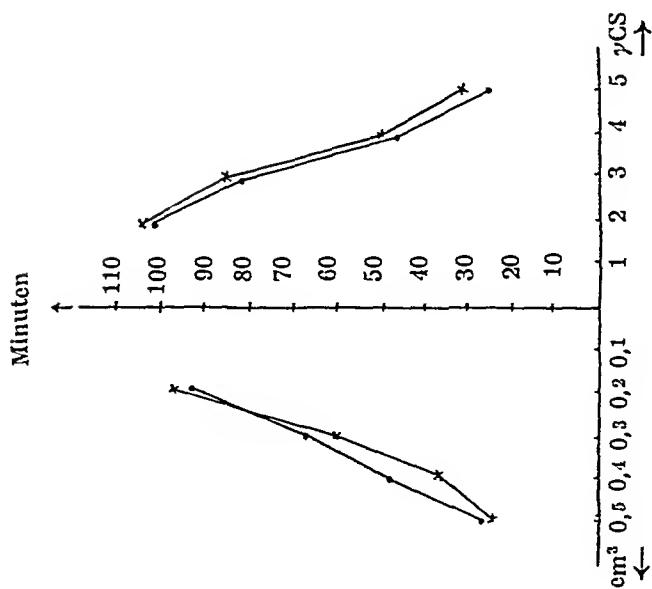


Abb. Nr. 14.

Versuch Nr. 2. (Vgl. Tabelle Nr. 43.)

• — Bildungssprobe (Verdünnung 1 : 25)

0,3: 11,00 } 10,38.—259,5 γ/cm<sup>3</sup>

0,4: 9,75 }

× — O-Probe (Verdünnung 1 : 25)

0,3: 12,33 } 12,04—10,00=2,04—51,0 γ/cm<sup>3</sup>

0,4: 11,75 }

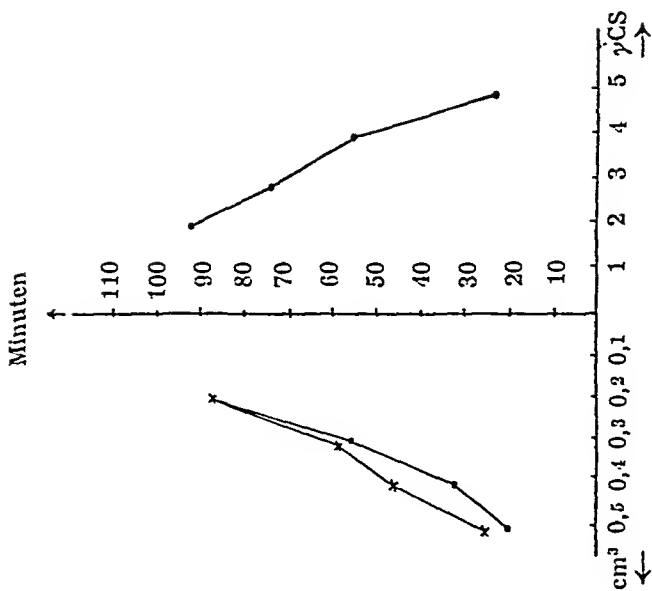


Abb. Nr. 15.

Versuch Nr. 14. (Vgl. Tabelle Nr. 43.)

• — Bildungssprobe (Verdünnung 1 : 25)

0,3: 13,33 } 12,42—10,00=2,42—60,5 γ/cm<sup>3</sup>

0,4: 11,50 }

× — O-Probe (Verdünnung 1 : 25)

0,3: 12,67 } 11,71—10,00=1,71—42,75 γ/cm<sup>3</sup>

0,4: 10,75 }



Tabelle Nr. 43.

Aerobe CS-Bildung bei Parallel-Bestimmungen mit der Thunberg-Methodik. CS in mg.

Nr.	Gewebe	Substrat	THÜNBERG-Methodik			Pentabrom-aceton-Methode			Unterschied
			O-Probe	Bildungsprobe.	Gebildete CS	O-Probe	Bildungsprobe	Gebildete CS	
1	Herzmuskel	l-Äpfelsäure (m/100) + Brenztraubens. (m/100) (gekochtes Gewebe)	3.68	3.43	-0.25	0.05	0.05	0	-0.25
2	,	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubens. (m/200)	2.79	14.25	11.46	0.75	9.96	9.21	2.25
3	,		2.80	14.19	11.39	0.75	9.96	9.21	2.18
4	,	$\alpha$ -Ketoglutarsäure (m/50)	2.72	7.23	4.51	0.51	2.94	2.43	2.08
5	,	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubens. (m/200)	1.93	8.82	6.89	0.48	6.12	5.64	1.25
6	,	$\alpha$ -Ketoglutarsäure (m/100)	1.86	5.85	3.99	0.51	4.38	3.87	0.12
7	,	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubens. (m/200)	1.66	14.81	13.15	0.65	11.40	10.75	2.45
8	,	$\alpha$ -Ketoglutarsäure (m/200)	6.21	24.71	18.50	0.65	15.36	14.79	3.71
9	,	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubens. (m/100)	5.49	9.61	4.11	0.65	4.42	3.77	0.34
10	Nierengewebe	Fumarsäure (m/200) + Brenztraubens. (m/200)	1.82	8.17	6.35	0.24	6.12	5.88	0.47
11	,	,	1.78	7.88	6.10	0.24	6.12	5.88	2.00
12	,	,	0.48	8.89	8.41	0.68	8.40	7.71	0.70
13	,	l-Äpfelsäure (m/1000) + Brenztraubens. (m/250)	0.82	8.06	7.24	0.81	7.68	6.87	0.37
14	,	$\beta$ -Oxybuttersäure (m/100)	2.35	3.32	0.97	0.62	1.80	1.18	-0.21
15	,	$\beta$ -Oxybuttersäure (m/1000) + l-Äpfelsäure (m/250)	2.00	4.42	2.42	0.75	3.24	2.49	-0.07
16	,	,	1.89	3.33	1.54	1.62	2.67	1.05	0.49

ist festzustellen, dass die Äpfelsäure und Brenztraubensäure, wenigstens in den verwendeten Konzentrationen, nicht störend auf die CS-Werte wirken. Zweitens geht aus dieser Probe hervor, dass im gekochten Gewebe keine CS-Bildung stattfindet. Der selbe Umstand wurde auch früher schon mit anderer Methodik festgestellt

In allen untersuchten Fällen findet man dieselbe CS-Zunahme in den Suspensionen wie auch mit der Pentabromacetonmethode. Der Umstand, dass die Werte ermittelt mit der THUNBERG-Methode grösser sind, dürfte wenigstens teilweise dadurch zu erklären zu sein, dass ausser der CS auch die iso-CS bestimmt wird. Das Verhältnis dieser beiden Säuren schwankt ja nach den Angaben der verschiedenen Forscher etwas, iso-CS soll 10—16 % der CS ausmachen. Daneben dürften aber auch die möglichen Spontandonatoren störend wirken bei der enzymatischen Bestimmung.

Unter den Ergebnissen ist besonders die Steigerung der CS-Werte durch  $\beta$ -Oxybuttersäure hervorzuheben. Die Stellung dieser Säure als CS-Bildner konnte also auch bei Verwendung der THUNBERG-Methodik bestätigt werden.

*Zusammenfassung:* Mit der enzymchemischen Methode von THUNBERG erhält man entsprechende Resultate über die CS-Bildung nach Zusatz von den Säuren, welche sich schon vorher bei Bestimmungen mit der Pentabromacetonmethode als CS-Bildner erwiesen hatten.

## B. Der Citronensäureabbau in Gewebesuspensionen.

Obwohl bekannt war, dass die CS abbauenden Enzyme auch im Tierkörper allgemein reichlich vorkommen, war zu Beginn dieser Arbeit keine einzige systematische Untersuchung ausgeführt worden, in der durch Verfolgen des Verschwindens der CS die Fähigkeit der Gewebesuspension die Säure zu eliminieren festgestellt worden wäre. Letztes Jahr haben ADLER, v. EULER, GÜNTHER und PLASS (1939) bei Methylenblauversuchen mit Geweben vom Schwein die iso-CS-Dehydrogenase untersucht und JOHNSON (1939) wiederum bei Bestimmung der iso-CS bei Ratten die Aconitase. Endlich hat BREUSCH (1939), genau wie ich bei meinen mit Geweben vom Rind vorgenommenen Versuchen, durch Bestimmung der unzersetzt verbliebenen CS bei Ratten und Meerschweinchen die Wirkung dieser beiden Enzyme untersucht. Er basierte seine Versuche in Organsuspensionen auf das herrschende Gleichgewicht zwischen iso-CS und CS, welches nach MARTIUS

(1938) 1: 10 sein soll, während JOHNSON (1939) behauptet, dass die iso-CS ganze 16 % ausmache.

Vom Standpunkte der CS-Bildung aus war es auf jeden Fall interessant zu untersuchen, in wiefern das Gewebe vom Rind unter entsprechenden Bedingungen im stande sei die CS abzubauen, ist doch schon wiederholt festgestellt worden, dass eine derartige Zersetzung regelmässig neben der Bildung stattfindet. Ferner war es, vorausgesetzt dass die Trennung dieser beiden Systeme von einander gelänge, von Bedeutung festzustellen wie die Gewebegifte den CS-Abbau beeinflussen.

### 1. Aconitase und iso-Citronensäure-Dehydrogenase.

BREUSCH (1939) beobachtete bei seinen Versuchen den völligen Abbau der CS in allen untersuchten Geweben. So ist auch bei meinen Versuchen der Fall gewesen (Tabelle Nr. 44), obgleich

Tabelle Nr. 44.

*Aerober Abbau von CS in verschiedenen Geweben. Nach Zusatz von 100 mg abgebaute Menge CS.*

Gewebe	Nach 15 Min. O <sub>2</sub> -Einleitung	Nach Bebrütung in Min.			
		30	60	120	240
Leber .....	33	65	68	82	99
„ .....	32	56	65	78	97
Herzmuskel.....	22	32	41	62	89
„ .....	22	32	45	59	80
Nieren .....	15	27	36	40	56
„ .....	15	—	36	36	55
Skelettmuskel.....	16	25	28	32	42
„ .....	—	—	—	—	47
Lunge .....	14	20	24	27	34
„ .....	—	—	—	—	28
Gehirn .....	10	15	20	26	33
„ .....	—	—	—	—	28
Testis .....	10	15	20	23	27
„ .....	—	—	—	—	25
Schilddrüse .....	9	9	12	17	24
„ .....	—	—	—	—	20
Nebennieren .....	3	13	13	18	22
„ .....	—	—	—	—	20
Milz .....	2	4	10	15	16
„ .....	—	—	—	—	15
Thymus .....	2	4	7	13	14
„ .....	—	—	—	—	12

sie unter für die CS-Bildung optimalen Bedingungen vorgenommen wurden. Die Reaktion,  $\text{pH} = 8.0$  (1 % Bicarbonatpuffer) entspricht jedoch ungefähr dem von REICHEL und NEEF (1935) festgestellten Optimum für die CS-Dehydrase, ebenso die Bebrütungswärme von  $37^\circ \text{C}$ .

Nach 4-stündiger Bebrütung ist der CS-Gehalt in allen Suspensionen um über 10 % gesunken. Hierbei ist die Abnahme der Säure in Leber und Herzmuskel sehr viel stärker als in den anderen Geweben, wie aus Abb. Nr. 16 deutlich hervorgeht. Die folgenden in der Reihenfolge sind Nieren, Skelettmuskel, Lungen, Gehirn, Testis, Schilddrüse und Nebennieren. In Milz und Thymus jedoch ist der CS-Verlust unter 16 %, also unter der von JOHNSON (1939) gesetzten Grenze zwischen CS und iso-CS. Rechnet man dagegen nach dem von MARTIUS angegebenen Werte, enthalten alle Gewebe sowohl Aconitase als auch iso-CS-Dehydrogenase.

Verfolgt man die CS-Abnahme zeitlich (Abb. Nr. 16) so ist zu bemerken, wie schnell diese Reaktion vor sich geht, denn schon im Verlaufe der ersten halben Stunde verschwindet bereits der grösste Teil der Säure. Scheinbar ist das Gewebe bestrebt so schnell wie möglich eine Art Gleichgewichtszustand herbeizuführen. Beim Vergleich mit den synthetischen Versuchen ist hier also eine gewisse Parallelität festzustellen, denn gerade bei kurzer Bebrütungszeit kam der Bildungseffekt am deutlichsten zum Vorschein. Es ist daher auch offenbar, dass in den Geweben eine viel stärkere CS-Bildung geschieht als wie die synthetischen Versuche zeigen.

Die Versuche wurden ausgeführt unter Zusatz von 100 mg CS zur Gewebesuspension (20 g Gewebe + 50 cm<sup>3</sup> Natriumbicarbonat). Die CS-Bestimmungen wurden dann nach einer bestimmten Zeit vorgenommen, so dass der zeitliche Verlauf des CS-Verlustes festgestellt wurde. Wegen der geringen Grösse der Organe wurden von Nebennieren und Schilddrüse nur 10 g verwendet.

In Übereinstimmung mit den von JOHNSON (1939) bei Ratten erhaltenen Resultaten enthielt auch in meinen Versuchen das Blut vom Rind keine die CS abbauenden Enzyme. Die in Tabelle Nr. 45 zusammengestellten Versuche wurden teils mit frischem nicht hämolysiertem, teils mit hämolysiertem Blut ausgeführt. Auf Grund der letzteren scheinen auch die roten Blutkörperchen so gut wie gar keine abbauenden Enzyme zu enthalten, denn nach der Hämolysie müssten sie ja freierwerden und ihre Wirkung entfalten können.

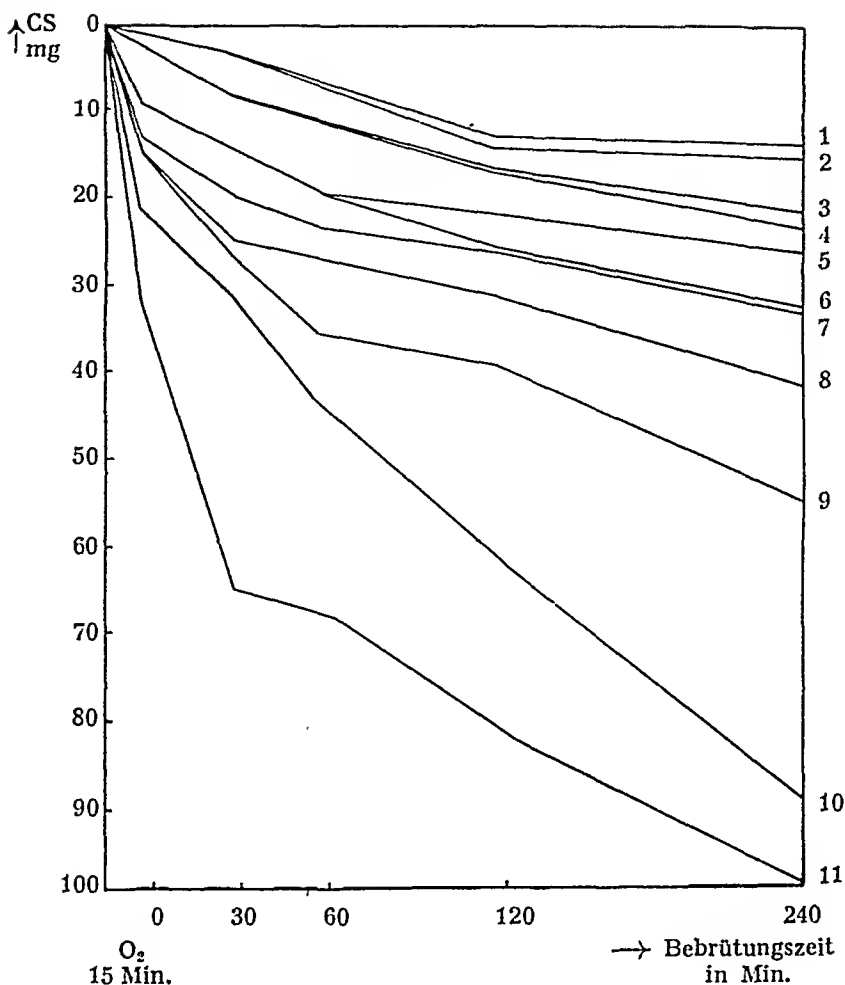


Abb. Nr. 16.

## Aerober CS-Abbau in verschiedenen Geweben.

- |                 |                   |
|-----------------|-------------------|
| 1. Thymus.      | 7. Lunge.         |
| 2. Milz.        | 8. Skelettmuskel. |
| 3. Nebennieren. | 9. Nieren.        |
| 4. Thyreoidea.  | 10. Herzmuskel.   |
| 5. Testis.      | 11. Leber.        |
| 6. Gehirn.      |                   |

Die Bestimmungen mit frischem Blut wurden vorgenommen, indem in der Schlächterei unmittelbar nach dem Töten des Tieres das Blut in eine Massflasche getan wurde, in welcher bereits eine bestimmte Menge Citrat war. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde dann die Abnahme des CS-Gehalts untersucht. — Die Hämolyse wurde durch Verdünnung des Blutes mit dem gleichen Quantum Wasser und kräftiges Schütteln bewirkt. Erst hiernach wurde das Citrat hinzugefügt.

Tabelle Nr. 45.

Versuche über das Vorkommen CS abbauender Enzyme im Blut (Zusatz von ca. 100 mg CS zu 20 cm<sup>3</sup> Blut). CS in mg.

	Zugefügte Menge CS	Wiedergefundene CS nach Bebrütung von			
		30 Min.	60 Min.	120 Min.	240 Min.
Nichthämolyisiertes Blut	110	110	108	108	110
„ „	130	128	131	133	131
Hämolyisiertes Blut....	115	117	113	118	115
„ „ ....	134	133	133	134	132

Bei den anaeroben Bildungsversuchen wurde, wie wir uns erinnern, ausser von  $\alpha$ -Ketoglutar säure beinahe garnicht CS gebildet. Zum Vergleich wurde auch eine Reihe von Versuchen über den anaeroben Abbau der CS vorgenommen (Tabelle Nr. 46).

Tabelle Nr. 46.

Anaerober CS-Abbau in verschiedenen Geweben. Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Gewebe	Nach 15-Min. N <sub>2</sub> -Einleitung	Nach Bebrütung von			
		30 Min.	60 Min.	120 Min.	240 Min.
Leber .....	—	54	58	70	91
Herzmuskel ....	18	30	—	52	64
Nieren .....	—	24	—	36	—
Skelettmuskel ....	—	19	—	30	—
Lunge .....	—	15	—	25	—
Gehirn .....	—	10	20	24	32
Testis .....	—	13	19	22	28
Nebennieren.....	—	13	—	19	—
Milz .....	—	5	10	15	16

Die Ergebnisse entsprechen den aeroben Versuchen mit denselben Geweben. Ein deutlicher Unterschied in Form von vermindertem Abbau ist nur in Leber und Herzmuskel zu beobachten. In diesen Fällen kann man eventuell annehmen, dass die in reichlichem Masse gebildeten Zwischenprodukte, welche wohl nur aerob weiter abgebaut werden, hemmend auf den CS-Abbau wirken.

## 2. Der Einfluss der Gewebsgifte auf den Citronensäureabbau.

Die Wirkung verschiedener Gifte auf den CS-Umsatz haben schon früher BATTELLI und STERN (1911) mittels Atmungsversuchen untersucht, bei welchen der beschleunigende Effekt der CS auf die Atmung geprüft wurde. Sie konstatierten, dass Arsenit die beschleunigte Atmung völlig aufhebt, Fluorid wirkte dagegen in ihren Versuchen eher in umgekehrter Richtung. Toluol hatte garkeinen Einfluss. LANGECKER (1934) untersuchte den CS-Abbau in Geweben vom Kaninchen und stellte hierbei fest, dass Toluol keine Wirkung hatte und dass Cyanid wiederum die Dehydrierung verhinderte. Diese Versuche wurden mit Leber ausgeführt.

Zu meinen Versuchen mit Gewebe vom Rind wurde Leber verwendet, weil diese, wie ich festgestellt habe, am meisten abbauende Enzyme enthält. Die Giftwirkung wurde geprüft indem zu einer von zwei Parallelproben Gift hinzugefügt wurde. Die Versuche geschahen in Gegenwart von Sauerstoff.

### *Arsenigsäure.*

Tabelle Nr. 47 zeigt, dass nicht einmal sehr hohe Konzentrationen Arsenigsäure (m/100) den Abbau hemmen, eher umgekehrt. Nach BANGA, SCHNEIDER und v. SZENT-GYÖRGYI (1931) hemmen schon Mengen von m/1280 vollkommen die Gewebsatmung. Die CS-Bildung wurde in meinen Versuchen in hohem Grade gehemmt durch Arsenit, unabhängig davon welcher Baustoff als Substrat verwendet wurde.

Tabelle Nr. 47.

*Die Wirkung von Arsenigsäure (Na) auf den aeroben CS-Abbau im Lebergewebe. Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.*

Bebrütungszeit	Zugesetztes Arsenit				
	0	m/1000	m/600	m/400	m/100
30 Min. ....	36.4	35.7	33.2	32.3	31.5
60 „ .....	28.0	27.0	26.3	23.2	23.2
120 „ .....	16.7	16.6	16.0	15.6	16.1

### *Natriumcyanid.*

Auf die CS-Synthese wirkte, wie erwähnt, Cyanid viel schwächer ein als Arsenit, jedoch war die Wirkung trotzdem deutlich. Der CS-Abbau wird dagegen beeinflusst im Gegensatz zu Arsenit (vgl. Tabelle Nr. 48).

Tabelle Nr. 48.

Die Wirkung von NaCN auf den aeroben CS-Abbau im Lebergewebe.  
 Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Bebrütungszeit	Zugesetztes NaCN				
	0	m/1000	m/500	m/250	m/100
30 Min. ....	27.2	37.8	37.4	39.1	43.6
60 „ ....	28.1	—	31.5	—	46.6
120 „ ....	19.1	—	24.5	30.0	39.9

### Natriumfluorid.

Wie in den Versuchen von BATTELLI und STERN (1911) bei beschleunigter Gewebsatmung so war auch hier Natriumfluorid ohne Einfluss auf den CS-Abbau in Lebergewebesuspensionen, eher noch wurde er etwas beschleunigt. Ebenso war die Wirkung auf die synthetischen Enzyme ganz undeutlich.

Tabelle Nr. 49.

Die Wirkung von NaF auf den aeroben CS-Abbau im Lebergewebe.  
 Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Bebrütungszeit	Zugesetztes NaF			
	0	m/100	m/50	m/25
30 Min. ....	53.5	52.0	41.0	38.9
60 „ ....	31.0	29.5	22.2	21.4
120 „ ....	22.3	21.0	17.7	14.5

### Toluol.

Im Gegensatz zu der stark hemmenden Wirkung bei den synthetischen Versuchen hatte der Toluol keinen Einfluss auf den CS-Abbau, wie aus Tabelle Nr. 50 hervorgeht.

### Malonsäure.

Malonsäure, das spezifische Gift der Bernsteinsäuredehydrase (QUASTEL, 1926; GÖSZY und v. SZENT-GYÖRGYI, 1934), hemmt in gewissem Grade auch den CS-Abbau in den Suspensionen (Tabelle Nr. 51). Vielleicht kann dieser Umstand teilweise die Verstärkung der CS-Bildung aus Oxallessigsäure, Äpfelsäure, Fumarsäure nach Zusatz von Malonat erklären.



Tabelle Nr. 50.

Die Wirkung von Toluol auf den aeroben CS-Abbau im Lebergewebe.  
Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Bebrütungszeit	Zugesetztes Toluol	
	0	10 cm <sup>3</sup>
30 Min. ....	39.5	39.0
60 „ .....	29.1	29.9
60 „ .....	27.4	26.9
120 „ .....	18.0	17.7

Tabelle Nr. 51.

Die Wirkung von Malonat auf den aeroben CS-Abbau im Lebergewebe.  
Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Bebrütungszeit	Zugesetztes Malonat			
	0	m/150	m/100	m/10
30-Min. ....	37.8	43.6	48.0	47.2
60 „ .....	28.0	—	31.2	44.6
120 „ .....	20.0	—	23.3	29.5

Übersieht man die Wirkung der einzelnen Gifte auf die CS-Bildung und deren Abbau in den Gewebesuspensionen im Hinblick auf ihre Verwendung zur Trennung der beiden den CS-Umsatz beeinflussenden Komponenten von einander, kommt man zu dem Schlusssatz, dass Arsenigsäure und Toluol zur Hemmung der CS-bildenden Enzyme verwendet werden können, während ein nur auf die abbauenden Enzyme wirkendes Gift, welches die Bildung nicht beeinflusst, unter den geprüften Giften nicht zu finden ist.

### 3. Der Einfluss einiger wahrscheinlich als Baustoffe der Citronensäure in Frage kommender organischer Säuren.

Da es möglich erschien, dass die Säuren, die sich bei den Syntheseversuchen als CS-Bildner erwiesen hatten, in einer oder der anderen Art hemmend auf den Umsatz der CS und speziell deren Abbau einwirken könnten, wie MÄRTENSSON (1939) auf Grund von seinen Perfusionsversuchen behauptet, habe ich diese Frage mittels einiger Versuchsserien untersucht.

Zu den Versuchen wurde statt Lebergewebe Herzmuskel und Nieren verwendet, da diese ausser viel abbauende auch reichlich synthetisierende

Enzyme enthalten. Ausser dem Gewebe als solchem wurde auch nach den Vorschriften von SCHERSTEN (1937) angefertigte Dehydrasenauszüge verwendet (vgl. weiter unten). Jedoch benutzte ich anstatt des von ihm angegebenen Phosphat- oder Wasserauszugs solche mit 1 % Natriumbicarbonatlösung.

Tabelle Nr. 52.

Versuche über den Einfluss verschiedener Substrate auf den CS-Abbau im Gewebesuspensionen und Gewebeauszügen. Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge in mg.

Ausser CS zugefügtes Substrat	Gewebesuspension		Gewebeauszug	
	Herzmuskel	Niere	Herzmuskel	Niere
Ohne Substrat .....	76.4	51.4	89.0	88.6
Brenztraubensäure (m/100) ....	74.0	59.8	88.0	87.0
l-Äpfelsäure (m/100) .....	73.2	54.0	88.0	87.8
Brenztraubensäure (m/100) + l-Äpfelsäure (m/100) .....	93.8	75.0	88.0	88.6
Oxalessigsäure (m/100) .....	72.5	53.8	88.0	88.6
Brenztraubensäure (m/100) + Oxalessigsäure m/100) .....	86.4	62.2	88.5	87.8
$\alpha$ -Ketoglutarsäure (m/100) ....	—	70.8	88.5	87.0
$\alpha$ -Ketoglutarsäure (m/25) .....	66.8	73.4	88.5	88.6
$\beta$ -Oxybuttersäure (m/100) ....	74.0	54.6	89.0	87.0
Essigsäure (m/50) .....	76.4	51.0	89.0	87.0

Tabelle Nr. 52 zeigt, dass die verwendeten Säuren den Abbau der CS nicht hindern und weiter, dass er auch in Gegenwart der synthetisierenden Enzyme vorsichgeht, jedoch in verschieden starkem Masse abhängig von den einzelnen Substraten. Bei Versuchen innerhalb ziemlich enger Grenzen (REICHEL und NEEF, 1935) kann man die Dehydrierung praktisch als unabhängig von der anwesenden Substratquantität ansehen. Der scheinbare Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen ist dabei durch CS-Bildung zu erklären, dies wird umso deutlicher wenn man die von dem Versuch ohne CS-Zusatz abweichenden Resultate mit den bei den früher vorgenommenen synthetischen Versuchen erhaltenen Werten vergleicht.

*Zusammenfassung:* Auf Grund der ausgeführten Gewebsversuche muss als hauptsächlichster Abbausort der CS beim Rind die Leber angesehen werden. Aber auch in Herzmuskel, Nieren und Skelettmuskeln sind viel abbauende Enzyme vorhanden.

Ausser diesen ist ferner noch Aconitase und iso-CS-Dehydrogenase in Lungen, Gehirn, Testis und Schilddrüse enthalten. Dagegen enthält Thymus, Nebennieren und Milz mit Sicherheit nur das erstere Enzym.

Arsenigsäure und Fluorid hemmen den CS-Abbau nicht, Cyanid und Malonsäure dagegen wohl in gewissem Grade. Toluol hat keine nennenswerte Wirkung. — Die als CS-Bildner nachgewiesenen organischen Säuren hindern in keiner Beziehung ihren Abbau. Sie können daher nicht durch Verhinderung der CS-Verbrennung zu einer scheinbaren CS-Bildung führen, sondern sind eher als Baustoffe bei der Synthese anzusprechen.

## C. Die Trennung der die Citronensäure bildenden und abbauenden Enzyme von einander.

### 1. Die Beständigkeit der Enzyme im Gewebe.

Da die Synthese und der Abbau der CS in den Suspensionen gleichzeitig vorsichgeht, war die Untersuchung beider schwierig. Besonders die CS-Bildung, die in einigen Fällen sehr gering war, liess sich schwer nachweisen.

Wir stellten schon fest (vgl. S. 45), dass die Reaktion von Bedeutung für die CS-Bildung war, indem diese viel schneller vorsichging bei alkalischer Pufferung. Jedoch selbst bei optimaler Reaktion, pH 8.0, kommt es noch zu einem sehr starken CS-Abbau. Auch mit Giften konnten in dieser Beziehung keine Resultate erhalten werden. Zwar wird die CS-Synthese gehemmt, der Abbau der Säure dagegen nicht auf entsprechende Art.

Als eine Möglichkeit zur Trennung dieser beiden entgegengesetzten Enzymgruppen von einander liesse sich eventuell ihre verschieden starke Haltbarkeit bei längerer Aufbewahrung der Gewebe denken.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden Versuche mit Nieren und Herzmuskel ausgeführt, wobei die Bildung und der Abbau der CS nebeneinander verfolgt wurden. Die Bestimmungen wurden vorgenommen direkt nachdem das Gewebe aus der Schlächtereie erhalten wurde und an den darauffolgenden Tagen. Die Gewebsmasse wurde im Eisschrank bei  $-4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Vor Beginn des Versuchs wurde die erforderliche Menge Gewebe erst bei Zimmertemperatur aufgetaut. — Zu jedem Versuch wurden 20 g Gewebe und 50 cm<sup>3</sup> 1 % Natriumbicarbonatpuffer, wie bei den früheren Experimenten, verwendet.

Tabelle Nr. 53.

Versuche über die Beständigkeit der CS auf- und abbauenden Enzyme. CS in mg.

Zeitpunkt der Bestimmung	Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge nach 120 Min.		Nach 30 Min. gebildete CS nach Zusatz von			
			l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubensäure m/200		α-Ketoglutar-säure (m/100)	
	Herzmuskel	Nieren	Herzmuskel	Nieren	Herzmuskel	Nieren
Sogleich ....	30.0	67.4	17.22	9.60	11.04	2.56
Nach 1 Tag	35.6	—	19.20	—	5.12	—
" 2 Tagen	—	68.2	—	7.92	—	1.88
" 3 "	52.4	—	24.48	—	3.20	—
" 5 "	54.4	67.4	18.22	3.52	2.80	1.12
" 16 "	75.6	—	1.20	—	0.70	—

Tabelle Nr. 53 zeigt, dass sowohl die abbauenden als auch die synthetisierenden Enzyme verhältnismässig beständig sind in den Geweben. In den Nieren scheint die Dehydrase sich besser zu konservieren, nach 6 Tagen ist die Fähigkeit CS abzubauen unverändert während der Bildungseffekt beinahe zwei Drittel kleiner ist.

Im Herzmuskel nimmt der CS-Abbau schon nach dem ersten Tage ab. Ebenso ist es mit der CS-Bildung aus α-Ketoglutar-säure. Die CS-Bildung aus Brenztraubensäure und Äpfelsäure scheint dagegen anfangs zuzunehmen, nimmt aber dann auch bald ab und erreicht am 16. Tage den 0-Punkt. Wieder verhält sich also die CS-Bildung aus α-Ketoglutar-säure anders als aus den anderen Säuren.

## 2. Dehydrasepräparate.

Seit der Entwicklung der neueren enzymchemischen Methodik ist es möglich aus Leber gute Dehydrasepräparate anzufertigen. Besonders BERNHEIM (1928), HARRISON (1931), GEMMIL (1934), LANGECKER (1934), BERNHEIM und BERNHEIM (1934, 1935), MARTIUS und KNOOP (1937, 1938), SCHERSTÉN (1937) und SJÖSTRÖM (1937) u. a. haben viel mit CS-Dehydrasen gearbeitet. Durch Verwendung verschiedener Verfahren gelang es sogar Präparate, die sich zur CS-Bestimmung eignen, herzustellen (SJÖSTRÖM, SCHERSTÉN). Da aber in Zusammenhang mit diesen Präparaten nie die Rede von den synthetisierenden Enzymen war, schien es berechtigt zu prüfen wie jene sich hierbei verhielten.

Zuerst wurde diese Frage untersucht, indem Herzmuskel und Nierengewebe kräftig mit Aceton oder Alkohol und dann mit Äther extrahiert wurden.

*Aceton-Äther Trockenpräparat:*

150 g gemahlene Gewebsmasse wird wie folgend verarbeitet:

10 Min. mit 7-facher Menge Aceton

3 » » 3- » » »

10 » » 3- » » » extrahieren unter kräftigem Schütteln. Danach wird das Präparat noch 2-mal mit Aceton getrocknet, wobei der Aceton in einer Nutsche abgesaugt wird. Hiernach wird noch mit der 2-fachen Menge Äther ausgezogen und anschliessend wird das Präparat zum Trocknen auf ein Filtrierpapier ausgebreitet. Ergebnis 30.8 g.

*Alkohol-Äther Trockenpräparat:*

150 g Gewebsmasse wird wie oben behandelt, nur dass statt Aceton Alkohol in gleichen Mengen verwendet wird. Ergebnis 28.8 g.

**Tabelle Nr. 54.**

*Aerober CS-Auf- und Abbau in Aceton- und Alkohol-Äther-Trockenpräparaten des Herzmuskels.*

Präparat	Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge nach 120 Min. in mg	Nach 30 Min. gebildete CS in mg nach Zusatz von		
		Brenztraubensäure (m/200)	Oxalessigsäure (m/200)	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubensäure (m/200)
Aceton-Äther . . .	92.4	0	0	0
» . . . .	96.5	0	0	0
Alkohol-Äther . . .	101.0	0	0	0
» . . . .	98.9	0	0	0

Aus Tabelle Nr. 54 geht hervor, dass nach Alkoholbehandlung keine CS mehr abgebaut, geschweige denn synthetisiert wird. Mit Aceton-Äther Präparaten kann man jedoch einen CS-Abbau konstatieren, wenn auch derselbe im Vergleich zu der ursprünglichen Abbaufähigkeit der Gewebe sehr gering ist.

*Aceton-Trockenpräparat nach BERNHEIM (1928):*

300 g fein gemahlene Gewebsmasse wird dreimal in einer Nutsche mit 150 cm<sup>3</sup> Aceton unter kräftigem Kneten gewaschen. Das so erhaltene

Präparat wird einen Tag lang im Vakuum getrocknet, wonach es 3 Stunden lang mit Ringerphosphat extrahiert wird. Anschliessend wird der Auszug filtriert und die Dehydrase enthaltende Flüssigkeit dialysiert.

Da in dieser Arbeit die Dehydrierung nicht mittels Methylenblau untersucht wurde, war die Dialysierung zur Entfernung der Salze unnötig. Daher wurde der nach Vakuum-Trocknung erhaltene Pufferauszug als solcher zu den Versuchen verwendet. Jedoch wurde zur Extraktion im Gegensatz zu der ursprünglichen Bestimmung 1 % Natriumbicarbonatlösung verwendet um die optimale Reaktion zu erhalten. — Zu jedem Versuch wurden die 20 g frischem Gewebe entsprechende Präparatmenge verwendet.

Tabelle Nr. 55.

*Aerobe CS-Auf- und Abbau in aus Herzmuskel nach BERNHEIM hergestellten Dehydrase-Trocken-Präparatauszügen und dem Extraktionsrückstand.*

Extraktionsmittel	Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge nach 120 Min. in mg	Nach 30 Min. gebildete CS in mg nach Zusatz von		
		Brenztraubensäure (m/200)	Oxalessigsäure (m/200)	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubensäure (m/200)
Ringerphosphat:				
1. Auszug . . . . .	86.0	0	0	0
2. Rückstand . . . . .	79.0	0	0	0
Na-bicarbonat (1%):				
1. Auszug . . . . .	86.8	0	0	0
2. Rückstand . . . . .	79.9	0	0	0

Auch durch dieses Verfahren wird die CS-Bildung nicht deutlicher (Tabelle 55). Zwar hält sich die CS-Dehydrase trotz der Acetonbehandlung in dem Trockenpräparat, aber es kommt zu keiner CS-Bildung, weder in dem Extraktionsrückstand noch dem Auszug. Aceton zerstört also allen Anschein nach die synthetisierenden Enzyme.

SCHERSTÉN (1937) gibt an im Vergleich hierzu bessere Resultate erhalten zu haben durch direkte Extraktion frischen Leberbreis und anschliessender Dialyse.

150 g frisches gemahlene Gewebe wird 3 St. lang im Eisschrank mit schon vorher eisgekühltem Ringerphosphat extrahiert, und zwar mit der 1.5—3-fachen Menge. Die Masse wird dann durch ein dichtes Tuch gepresst bis der Rückstand der ursprünglich verwendeten Gewebsmasse entspricht.

Aus dem schon oben erwähnten Grunde wurde in meinen Versuchen zum Ausziehen des Gewebebreis 1 % Natriumbicarbonatlösung benutzt. Auch wurde keine Dialysierung vorgenommen.

Ausser dem Auszug wurde auch der Enzymgehalt des Rückstands untersucht. Beide wurden zu den Versuchen in Mengen entsprechend 20 g des frischen Gewebes verwendet.

Tabelle Nr. 56.

*CS-Auf- und Abbau in Dehydraseauszügen nach SCHERSTEN und in dem Extraktionsrückstand. CS in mg.*

Gewebe	Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge nach 120 Min.		Aerob in 30 Min. gebildete CS nach Zusatz von	
	Aerob	Anaerob	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubensäure (m/200)	α-Ketoglutar-säure (m/100)
Herzmuskel:				
1. Frisches Gewebe ....	51.4	45.2	22.90	12.20
2. Bicarbonatauszug (1.5-fache Menge) .....	66.2	66.6	0	2.90
3. Extraktionsrückstand	59.0	49.0	26.90	11.50
Herzmuskel:				
1. Bicarbonatauszug (3-fache Menge) .....	48.4	—	0	1.50
2. Extraktionsrückstand	30.0	—	18.82	2.32
Herzmuskel:				
1. Bicarbonatauszug (1.5-fache Menge) .....	68.4	—	1.68	1.08
2. Extraktionsrückstand	14.0	—	14.42	5.25
Nieren:				
1. Frisches Gewebe ....	59.4	58.1	11.20	1.96
2. Bicarbonatauszug (1.5-fache Menge) .....	81.0	81.0	2.60	0.92
3. Extraktionsrückstand	54.6	58.6	11.36	0.80
Nieren:				
1. Bicarbonatauszug (3-fache Menge) .....	71.0	—	0	0
2. Extraktionsrückstand	62.6	—	7.68	0.80
Nieren:				
1. Bicarbonatauszug (1.5-fache Menge) .....	86.6	—	0.24	0.68
2. Extraktionsrückstand	59.8	—	6.80	0.64

Die die CS abbauenden Komponenten gehen verhältnismässig gut in den Auszug über (Tabelle Nr. 56), jedoch verbleibt auch ein ansehnlicher Teil in dem Extraktionsrückstand. Der Abbau scheint ungefähr genauso gross im gewaschenen wie im unbehandelten Gewebe zu sein, welches auf die geringe Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionen von der absoluten Enzymmenge zu deuten scheint, vorausgesetzt, dass noch genügend Enzyme vorhanden sind. Im Auszug ist der CS-Abbau jedoch viel kleiner. Zwischen aerob und anaerob angestellten Versuchen scheinen hier keine grösseren Unterschiede zu bestehen.

Bei Extraktion mit verschieden grossem Volumen war auch kein deutlicher Unterschied dieser Ergebnisse zu erzielen. Der Auszug enthält nur ausnahmsweise synthetisierende Enzyme und auch dann nur in minimalen Mengen. Die CS-Bildung scheint an die Gewebsmasse geknüpft zu sein.

Im Vorhergehenden wurde schon wiederholt auf die Übereinstimmung im Abbau und der Bildung der CS bei Versuchen mit  $\alpha$ -Ketoglutar säure hingewiesen. Die Extraktion des Gewebes führt jedoch zu abweichendem Resultat. Falls die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutar säure denselben Weg verlief wie der CS-Abbau, müssten die Dehydrasepräparate im stande sein aus einem Teil der Abbauprodukte wieder CS zu bilden, worauf frühere Versuche hinzuweisen schienen. Dies ist aber nicht der Fall in den Dehydraseauszügen. Natürlich könnte man sich denken, dass zu der rückläufigen Reaktion noch ein weiterer Faktor nötig sei, der bei der Extraktion zerstört würde oder in dem Rückstand verbliebe.

Vergleicht man die mit gewaschenem Gewebe erhaltenen Werte mit denen, die mit unbehandeltem Gewebe erhalten wurden, ist festzustellen, dass die Synthese in Herzmuskel und Nieren beinahe genauso gross ist. Aus Äpfelsäure und Brenztraubensäure ist die CS-Bildung jedoch im ungewaschenen Gewebe, vor allem was den Herzmuskel anbetrifft, stärker. Dagegen ist die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutar säure im gewaschenen Gewebe grösser.

### 3. Das Waschen des Gewebes.

Die oben beschriebenen Versuche mit dem Rückstand der Dehydraseauszüge bewiesen, dass die synthetisierenden Enzyme an die Gewebsmasse geknüpft sind. Bei Versuchen über den Brenztraubensäureumsatz haben u. a. LIPMANN (1937) und BANGA, PETERS und OCHOA (1938) im Gehirn eine viel effektivere Waschung benutzt. Der zuerst erwähnte Forscher liess gleichsam die Gewebe selbst in Gegenwart von Sauerstoff ihren Vorrat an Spontandonatoren



verbrennen, während der letztere durch eine gründlichere mechanische Waschung nebst wiederholter Extraktion im kalten zu dem gleichen Ergebnis zu kommen versuchte.

*Das Waschen des Gewebes nach PETERS* (vgl. BANGA, OCHOA und PETERS 1939): Waschen mit dreifachem Volumen.

1. Wasser.
2. „
3. Phosphatpuffer (pH = 7.5).
4. Ringerphosphat.

Anstatt Punkt 3. und 4. wurde hier im Gegensatz zu PETERS 1 % Natriumbicarbonatlösung verwendet, wie aus der Tabelle hervorgeht.

*Das Vorgehen nach LIPMANN:*

LIPMANN wiederum extrahiert 2-mal mit 5-facher Menge Ringerphosphat bei gleichzeitiger Durchleitung von Sauerstoff. Wärme 37° C.

*Ausführung:*

Die mit der Latapiemühle zerkleinerte Masse wird mit eisgekühlter Flüssigkeit (3-faches Volumen) gewaschen, wonach ca. 5 Min. zentrifugiert wird. Nach Abdekantierung der Flüssigkeit wird das Waschen wie in der Tabelle angegeben wiederholt. Zu jeder Bestimmung wurde die 10 g Gewebe entsprechende Masse, gepuffert in der 3-fachen Flüssigkeitsmenge, verwendet.

Übersehen wir die Ergebnisse (Tabelle Nr. 57) ist besonders auffallend, dass der Abbau der CS in Herzmuskelsuspensionen stark abnimmt je öfter das Gewebe gewaschen wird. Auch die CS-

Tabelle Nr. 57.

*Aerober CS-Auf- und Abbau im gewaschenen Herzmuskel. CS in mg.*

Waschung	Von 100 mg hinzugefügter CS wiederge- fundene Menge nach 120 Min.	In 30 Min. gebildete CS nach Zusatz von		
		l-Äpfelsäure (m/200)	Brenztrau- bensäure (m/200)	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztrau- bensäure (m/200)
Ohne Waschung ..	58.0	2.53	1.71	10.24
Phosphat-puffer (3 Mal) .....	—	0.10	0.10	3.80
1 %-Bicarbonat- puffer (3 Mal) ..	90.0	0.21	0.10	18.56
1 %-Bicarbonat- puffer (5 Mal) ..	96.8	0.14	0.10	13.92

Bildung aus Brenztraubensäure oder Äpfelsäure getrennt hört beinahe völlig auf, dagegen scheint die Bildung der CS bei Kombination dieser beiden Substrate eher zu als abzunehmen. Da die Dehydrase jetzt wenigstens nicht in gleich grossem Umfange das Deutlichwerden der CS-Bildung hindern konnte wie in den Versuchen mit unbehandelten Gewebssuspensionen, wäre zu erwarten gewesen, dass man durch längere Bebrütung zu noch grösseren Werten käme. Scheinbar haben aber auch die synthetischen

Tabelle Nr. 58.

*Aerober CS-Auf- und Abbau nach 5-facher Waschung des Herzmuskels (1% Nabcarbonatpuffer) zur Entfernung der die CS-abbauenden Enzyme. CS in mg.*

Bebrütungszeit	Von 100 mg hinzugefügter CS wiedergefundene Menge	Gebildete CS nach Zusatz von l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztraubensäure (m/200)
15 Min. ....	98.0	8.38
30 „ ....	96.0	8.58
45 „ ....	96.0	8.65
60 „ ....	95.5	8.87
120 „ ....	94.5	7.98

Enzyme durch das Waschen ebenfalls gelitten, da diese Zunahme der CS-Bildung nicht gefunden wurde (Tabelle Nr. 58).

Da die Bildung der CS aus einzelnen Säuren gehemmt zu sein schien, war es von Interesse zu untersuchen, wie sich die anderen 4-C-Dicarbonensäuren als die Äpfelsäure verhielten, und zwar sowohl allein als auch kombiniert mit Brenztraubensäure.

Tabelle Nr. 59.

*Aerobe CS-Bildung bei Kombination von Brenztraubensäure mit 4-C-Dicarbonensäuren im 5-mal mit Bicarbonatpuffer (1 %) gewaschenen Herzmuskel. CS in mg. Nach Zusatz von Brenztraubensäure allein = 0.1 mg CS in beiden Serien.*

Substrat	Substrat allein		Berechnete Summe		Kombinationsversuch		Zusatz	
	I	II	I	II	I	II	I	II
$\alpha$ -Ketoglutarensäure ..	0.20	—	0.30	—	1.68	—	1.38	—
Bernsteinsäure .....	0	0	0.10	0.10	4.64	1.28	4.54	1.18
Fumarsäure .....	0.10	0.14	0.20	0.24	7.84	2.40	7.64	2.16
l-Äpfelsäure .....	0.10	0.14	0.20	0.24	8.20	6.96	8.00	6.72
Oxallessigsäure .....	0.48	0.38	0.58	0.48	8.90	16.00	8.32	15.52

Tabelle Nr. 59 zeigt, dass im gewaschenen Herzmuskel mit Ausnahme von Oxalessigsäure aus keiner der geprüften Säuren allein CS gebildet wird. Anders ist es aber bei Kombination mit Brenztraubensäure, hierbei wird CS gebildet und zwar umso mehr je näher das zweite Substrat im Oxydationsgrad der Oxalessigsäure steht. Bei den Versuchen mit unbehandeltem Gewebe war, wie erwähnt, besonders auffällig, dass die Äpfelsäure im Herzmuskel viel stärker wirkte als die Oxalessigsäure. Diese Tatsache kann möglicherweise durch die Fähigkeit des Herzmuskels Oxalessigsäure schnell auf einem anderen Weg als über CS umzusetzen erklärt werden. Vielleicht wird die Säure teilweise zu Brenztraubensäure decarboxyliert. Der wahrscheinliche Abbau der Oxalessigsäure zu Brenztraubensäure würde auch erklären, warum aus dieser Säure im gewaschenen Herzmuskel noch CS gebildet wird. Es handelte sich einfach um die Kombinationswirkung von Oxalessigsäure mit der aus dieser entstandenen Brenztraubensäure. Der Umstand, dass die anderen 4-C-Dicarbonsäuren nicht gleichfalls eine Zunahme der CS-Bildung bewirken, ist meines Erachtens als ein Beweis gegen die Ansicht der ausschliesslich katalytischen Wirkung derselben anzusehen.

Besonders beachtenswert ist ferner noch das Verhalten der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bei diesen Versuchen. Auch aus ihr allein wird nämlich im gewaschenen Gewebe keine CS gebildet, obwohl sie im Vergleich zu den anderen Säuren im ungewaschenen Gewebe der stärkste CS-Bildner war. Auch bei Kombinationsversuchen entsteht aus ihr weniger als aus Bernsteinsäure, so dass hier die CS-Bildung gut als über Bernsteinsäure verlaufend erklärt werden kann. Die schwache Wirkung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure scheint in dem gewaschenen Gewebe der geringen Dehydrasewirkung parallel zu verlaufen.

Die mit Gehirn erhaltenen Resultate (Tabelle Nr. 60) entsprechen, was die CS-Bildungsfrequenz anbelangt, nicht einmal annähernd den Werten im Herzmuskel. Die CS-Bildung im Gehirn leidet offenbar durch das Waschen sehr. Jedoch kommt der Synthese-effekt aus Brenztraubensäure zusammen mit Äpfelsäure noch deutlich hervor.

*Zusammenfassung:* Die Trennung der CS abbauenden und synthetisierenden Enzyme von einander ist schlecht durchführbar. In den CS-Dehydrasepräparaten sind meist keine synthetisierenden Enzyme mehr vorhanden. Aceton- oder Alkoholbehandlung zerstört sie ganz. Bei Extraktion des Gewebes mit verschiedenen Pufferlösungen verbleiben sie gebunden an die Gewebsmasse, in der sich übrigens auch ein Teil der abbauenden Enzyme hält.

Tabelle Nr. 60.

*Aerobere CS-Auf- und Abbau im gewaschenen Gehirngewebe. CS in mg.*

Waschung	Von 100 mg hinzugefügter CS wiederge- fundene Menge	Gebildete CS nach Zusatz von		
		l-Äpfel- säure (m/200)	Brenz- trauben- säure (m/200)	l-Äpfelsäure (m/200) + Brenztrauben- säure (m/200)
Ohne Waschung ....	83.0	1.00	1.40	4.32
Phosphatpuffer (2-mal)	0	0.20	0.20	0.62
1- % Bicarbonatpuffer (2-mal) .....	—	0.34	0.36	0.82
Phosphatpuffer (4-mal ad Modum Peters)	0	0.10	0.10	0.42
Phosphatpuffer (ad modum Lipmann)..	0	0.18	0.16	0.55

Öfter wiederholtes Waschen des Gewebes entfernt die abbauenden Enzyme aus dem Gewebe; gleichzeitig wird auch die CS-Bildung aus Brenztraubensäure oder den 4-C-Dicarbonsäuren allein, abgesehen von der Oxalessigsäure, aufgehoben. Die alleinige Wirkung der Oxalessigsäure kann durch ihre teilweise Decarboxylierung zu Brenztraubensäure und die Kombination dieser beiden Säuren erklärt werden. — Auch im gewaschenen Herzmuskel entsteht aus Oxalessigsäure zusammen mit Brenztraubensäure mehr CS als bei Kombinationsversuchen mit den anderen 4-C-Dicarbonsäuren, dies ganz im Gegensatz zu den Resultaten der Versuche mit ungewaschenem Herzmuskel. — Aus  $\alpha$ -Ketoglutar-säure wird sowohl in Kombinationsversuchen als auch allein verwendet weniger CS gebildet als aus Bernsteinsäure, ganz entgegengesetzt zu den Ergebnissen mit unbehandeltem Gewebe.

#### D. Das Vorkommen der Citronensäure in verschiedenen Geweben.

Über den CS-Gehalt tierischer Gewebe liegen nur ganz wenig Untersuchungen vor. GEMMIL (1934) erhielt positive Resultate beim Frosch in Leber und Muskel und beim Kaninchen in Leber, Muskel und Nieren. Im Hundegewebe haben PUCHER, SHERMAN

und VICKERY (1936) Werte zwischen 1.5—0.1 mg % gefunden, wobei die Reihenfolge der Gewebe Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel und Leber war.<sup>1</sup> — Über den CS-Gehalt der Gewebe vom Rind liegen keinerlei Untersuchungen vor. Ausserdem schien es am Platze auch noch andere Organe als die erwähnten auf ihren CS-Gehalt hin zu untersuchen.

Tabelle Nr. 61.

CS-Gehalt in verschiedenen Geweben.

Gewebe	Anzahl Untersuchungen	Grösster Wert mg %	Kleinster Wert mg %	Mittelwert mg %
Milchdrüse .....	4	332.00	256.00	308.00
Schilddrüse .....	10	123.00	29.50	73.98
Testis .....	6	11.88	5.94	8.56
Ovarium .....	6	6.43	4.52	5.51
Gehirn .....	4	3.27	2.31	2.82
Lunge .....	4	2.86	2.20	2.52
Nebennieren .....	4	2.86	2.38	2.51
Pancreas .....	4	3.81	1.37	2.43
Thymus.....	4	2.20	1.67	1.85
Nieren .....	6	3.39	1.01	1.77
Milz .....	4	2.14	1.05	1.66
Parotisdrüse ....	4	1.79	0.95	1.46
Skelettmuskel ....	6	1.79	0.47	0.83
Herzmuskel ....	6	0.36	0.24	0.30
Leber .....	6	0.36	0.06	0.24

Wie in der Tabelle Nr. 61 zu sehen ist, können die Gewebe in drei Gruppen geteilt werden. Zu der ersten wäre ausser der Milchdrüse die Schilddrüse zu rechnen, da in diesen beiden Geweben sehr beachtenswerte CS-Mengen sind. Erinnern wir uns des reichlichen CS-Gehalts in der Milch scheint es natürlich, dass auch die Milchdrüse viel von dieser Säure enthält. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Milchdrüse vor der Bestimmung wiederholt gespült wurde zur völligen Entfernung der Milch.

Sonderbar scheint das reichliche Vorkommen der CS in der Schilddrüse. Wie in den Syntheseversuchen deutlich wurde, kommt

<sup>1</sup> Nach dem Niederschreiben dieser Arbeit ist eine Untersuchung von DICKENS (1940) erschienen, in der dieser über das Vorkommen von über 1000 mg % CS in den Knochen von Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen berichtet. Ziemlich grosse Mengen sind ferner in embryonalem Gewebe und Tumoren d. h. in den Geweben, wo ein starkes Wachstum stattfindet.

es in der Schilddrüse zu keiner entsprechenden CS-Bildung wie in den anderen Geweben. Auch der CS-Abbau war hier sehr langsam. Man könnte denken, dass die Drüse möglicherweise eine Art Depot für CS bilde, bei der kleinen Masse dieses Organs handelt es sich aber absolut genommen um nur sehr geringe CS-Mengen.

Zu der zweiten Gruppe sind Eierstöcke und Testis zu rechnen. SCHERSTÉN (1937) fand im Sperma vom Stier  $9.85 \pm 0.42$  % CS. Die Werte im Testisgewebe sind hiermit zu vergleichen, obwohl nach dem erwähnten Forscher die hauptsächlichste CS-Bildung in der Prostata vorsichgehen soll. — NITZESCU und GEORGESCU (1930) berichten, dass die Follikelflüssigkeit bei Kühen 4 mg % CS d. h. den von mir im Ovarium gefundenen Werten entsprechende Mengen, enthält.

In dem grössten Teil der Gewebe entspricht der CS-Gehalt dem Blut-Spiegel, welcher bei Bestimmungen im Gesamtblut von Rindern (5) zwischen 1.5—2.9 mg % schwankte.

Zur vierten Gruppe gehören alle die Gewebe, deren Wert unter dem des Blutes liegt: Skelettmuskel, Herzmuskel und Leber in der angeführten Reihenfolge. Alle diese Gewebe sind nach meinen Versuchen sehr starke CS-Abbauer, jedoch die zwei ersten auch gute CS-Bildner. Der relativ hohe CS-Gehalt der Nieren, trotz dem hier stattfindenden starken CS-Abbau, ist beachtenswert.

Die Vorbereitung der Gewebe zur Bestimmung wurde schon eingangs im Zusammenhang mit der Methodik besprochen. Von der Milch- und Schilddrüse wurde zu den Bestimmungen nur 0.5—1.0 g verwendet, von Leber und Herzmuskel 20 g und allen anderen Geweben 10 g.

*Zusammenfassung:* Alle untersuchten Gewebe vom Rind enthielten CS. Besonders viel CS enthält die Schilddrüse, vorüber früher keine Untersuchungen in der Literatur vorlagen. — Die Milchdrüse enthält dem CS-Gehalt der Milch entsprechende Mengen. — In Testis und Ovarien sind über dem Blutspiegel liegende CS-Mengen, während in Skelettmuskel, Herzmuskel und Leber darunter liegende Werte gefunden wurden. In allen anderen untersuchten Geweben, nämlich Gehirn, Lungen, Nebennieren, Milz, Nieren, Bauchspeicheldrüse, Parotis und Thymus, wurden die gleichen Werte wie im Blut gefunden.

## IV. Schlussbetrachtungen.

Die Ergebnisse wurden schon im Zusammenhang mit der Beschreibung der Versuche eingehend besprochen. Abschliessend ist es aber am Platze eine zusammenhängende kurze Übersicht über die wichtigsten Fragen zu geben.

Zuerst muss festgestellt werden, dass die CS-Bildung eine enzymatische Reaktion ist, die fest mit den lebenden Zellen verknüpft ist. Sie wird nicht durch eine katalytische Wirkung der Gewebsmasse als solcher hervorgerufen, ebenso wenig wie durch rein chemische Reaktion der Ausgangsstoffe (BREUSCH, 1937). Auch rufen die Vorläufer der CS nicht eine nur scheinbare Zunahme der Säure hervor durch Vergiftung der sie abbauenden Enzymsysteme (MÄRTENSSON, 1938). Arsenit, Toluol und Cyanid verhindern die CS-Bildung, während Fluorid in dieser Beziehung keinen nennenswerten Einfluss ausübt. — Das die CS-Bildung bewirkende Enzymsystem können wir »Citricogenase« nennen.

Es ist augenscheinlich, dass die CS-Synthese in Gewebesuspensionen in letzter Hand durch Reaktion von Oxalessigsäure mit Brenztraubensäure vorsichgeht. Sonderbar ist aber, dass in dem Gewebe, welches den stärksten Bildungseffekt hat, nämlich dem Herzgewebe, mehr CS entsteht in Gegenwart von l-Äpfelsäure als von Oxalessigsäure. Man könnte sich denken, dass die Oxalessigsäure in diesem Gewebe besonders leicht decarboxyliert wird, aber dann müsste aus ihr zusammen mit der bei der Kohlensäureabspaltung entstehenden Brenztraubensäure mehr CS gebildet werden als aus l-Äpfelsäure allein. Sehr grosse Oxalessigsäuremengen könnten ebenfalls eventuell durch Giftwirkung hemmend auf die CS-Bildung wirken oder vielleicht entsteht aus der l-Äpfelsäure leichter die aktive Form der Oxalessigsäure, die Ketoform, welche gleich mit der Brenztraubensäure reagieren könnte, während die verwendete Enolform der Säure erst in die aktive Form umgesetzt werden müsste. Dieser Umlagerungsprozess soll aber andererseits gleich

bei der Lösung der Säure vorsiegehen.<sup>1</sup> Vielleicht enthält der Herzmuskel besonders viel der die Äpfelsäure zu Oxalessigsäure umsetzenden Äpfelsäuredehydrase, wodurch ein reichliches Angebot an Oxalessigsäure gesichert würde. GREEN (1936) hat tatsächlich nachgewiesen, dass wenigstens bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Tauben am meisten von dieser Dehydrase im Herzmuskel zu finden ist. — Die durch kräftiges Waschen des Herzmuskels von mir festgestellte Umkehrbarkeit der CS-Bildungsintensität durch Äpfelsäure und Oxalessigsäure deutet auch daraufhin, dass hierdurch ein Faktor aus dem Gewebe entfernt wird. Hierbei könnte es sich gut gerade um die Äpfelsäuredehydrase handeln. Allgemein bekannt ist ja die relativ leichte Löslichkeit der Dehydrasen.

Die 4-C-Diearbonsäuren seheinen bei der CS-Bildung noch einen anderen Anteil zu haben, als nur die katalytische Wirkung auf den Umsatz der Brenztraubensäure. So wird unter gewissen Bedingungen aus Äpfelsäure zusammen mit Brenztraubensäure mehr CS gebildet als wie theoretisch berechnet aus der Menge der zugesetzten Brenztraubensäure entstehen könnte. Kleine Mengen der 4-C-Diearbonsäuren reichen übrigens auch nicht aus, um eine maximale CS-Bildung aus Brenztraubensäure hervorzurufen, welches bei rein katalytischer Wirkung der Fall sein müsste.

Auch der Einfluss der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure auf die CS-Synthese ist beachtenswert. Bei Vergleich der anaeroben Versuche bei verhältnismässig saurer Reaktion mit einerseits 4-C-Diearbonsäuren allein, vor allem Bernsteinsäure, andererseits  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, die ja als Abbauprodukt der CS angesehen wird, ist es möglich, dass die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ausser über die 4-C-Diearbonsäuren auch noch auf einem anderen Wege vorsiegehen muss.

Als erste Möglichkeit könnte man eine Stoekung des CS-Abbaus in Erwägung ziehen. Sehr kleine Mengen rufen nämlich keine Zunahme der CS-Bildung hervor. Aber andererseits wirkt die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure nicht hemmend auf den CS-Abbau in Präparaten, die nur die CS-oxydierenden Enzyme enthalten und daher auch keine CS synthetisieren.

Möglich ist aber auch, dass die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure selbst auf eine oder die andere Art zu der Synthese verwendet wird. Hierbei könnte es sich um die Kondensation zweier Moleküle handeln,

<sup>1</sup> Nach MEYER (1912) liegt 80 % der Säure in wässriger Lösung in Ketoform vor. HANZSCH (1915) dagegen gibt ein Zahl von 97% an und von 70% für schwach alkalische Lösungen.



wonach das entstandene Komplex zu CS oxydiert würde, oder auch könnte man sich denken, dass es zur Umkehrung der Reaktion der CS-abbauenden Enzyme käme. Es haben sich nämlich die Gewebe, die viel CS-oxydierende Enzyme enthalten, als besonders gute CS-Bildner aus  $\alpha$ -Ketoglutar säure erwiesen. Arsenit, welches die CS-Synthese aus anderen Säuren verhindert, hat keinen Einfluss auf die CS-Bildung aus  $\alpha$ -Ketoglutar säure, ebenso wenig wie durch dieses Gift die Dehydrierung der CS verhindert wird. Jedoch sind Präparate, die nur CS-dehydrierende Enzyme enthalten, auch nicht im Stande aus  $\alpha$ -Ketoglutar säure CS zu bilden. Die Umsatzprozesse des Organismus sind bekanntlich oft reversibel, bisher ist aber die Umkehrung der Decarboxylation für den tierischen Stoffwechsel niemals nachgewiesen worden.

Drittens ist nach SIMOLA (1939) eine Umaminierung zu erwägen, bei welcher aus Asparaginsäure, die immer im Gewebe vorhanden ist, Oxalessigsäure entstände. Als erste haben BRAUNSTEIN und KRITZMANN (1937) gezeigt, dass die Aminogruppe der Glutaminsäure an Ketosäuren übertragen werden kann. Nach COHEN (1939) ist eine derartige Umaminierung auch zwischen anderen Amino- und Ketosäuren möglich. Ausser zwischen  $\alpha$ -Ketoglutar säure und Asparaginsäure könnte gleichzeitig auch eine Umaminierung zwischen  $\alpha$ -Ketoglutar säure und Alanin stattfinden. So würden beide zur CS-Synthese notwendigen Säuren nebeneinander gebildet. Für diese Erklärungsmöglichkeit sprechen die Waschversuche der Gewebe, bei denen der Effekt der  $\alpha$ -Ketoglutar säure im Vergleich zu den anderen Vorläufern der CS auffallend stark abnimmt und sogar unter den der Bernsteinsäure sinkt.

Was die CS-Bildung bei Zusatz von Buttersäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure anbetrifft, scheint es möglich, dass diese über Brenztraubensäure verläuft, aus der ja etwas mehr CS gebildet wird, wie viele Versuche gezeigt haben. Auf nahe Beziehungen zwischen der Brenztraubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure deutet auch ihr ähnliches Verhalten bei der CS-Bildung in Kombinationsversuchen zusammen mit 4-C-Dicarbon säuren sowie bei der Malonsäurevergiftung hin. Die Malonsäure wirkt hemmend auf die CS-Bildung nach Zusatz von sowohl Brenztraubensäure als auch  $\beta$ -Oxybuttersäure und die 4-C-Dicarbon säuren wiederum verhindern diese hemmende Wirkung auf beide Säuren.

Bei Beurteilung der Bedeutung der CS-Bildung können folgende Gesichtspunkte erwogen werden:

1. Regulierung der Reaktion. — Bekanntlich ist die CS-Ausscheidung bei alkalotischen Zuständen sehr gross und bei acido-

tischen umgekehrt klein. Die starke CS-Bildung aus den zugesetzten Substraten, besonders bei alkalischer Reaktion der Gewebuspensionen deutet daraufhin, dass dieser Vorgang von Bedeutung sein kann bei der Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration der Gewebe.

2. Die Oxydation der Kohlenhydrate zu Kohlensäure und Wasser kann über CS verlaufen, gemäss dem CS-Cyklus, wobei als Zwischenprodukt Brenztraubensäure entstände. Diese Möglichkeit kommt wenigstens für Herzmuskel und Nieren eventuell auch für andere Gewebe in Frage, es braucht aber natürlich nicht der einzige Weg zu sein, auf welchem die Brenztraubensäure eliminiert wird. Es wäre beispielsweise denkbar, dass die überschüssige Brenztraubensäure über CS umgesetzt wird.

3. Andererseits könnte auch der Abbau der 4-C-Dicarbonensäuren über CS verlaufen. Hierbei kämen dann aber auch manche andere Gewebe in Frage und nicht nur die Nieren, wie BREUSCH (1939) behauptet hat.

4. Ein weiterer Zweck der CS-Bildung kann auch die Umsetzung zu Glutaminsäure sein, wobei  $\alpha$ -Ketoglutarensäure das Zwischenglied wäre. Derart könnten die Kohlenhydrate Anlass zur Bildung von Aminosäuren geben; aus Brenztraubensäure entstände somit ausser Alanin auch Glutaminsäure. Es ist aber noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob diese letztere Reaktion tatsächlich auch im Tierkörper vorsichgeht.

5. Der Abbau über CS kann möglicher Weise ferner ein Weg zu sein, auf welchem der Organismus Acetonkörper entfernt, verhält sich doch in den beschriebenen Versuchen die  $\beta$ -Oxybuttersäure genau wie die Brenztraubensäure. Diese Frage bedarf weiterer Erklärung.

Ein Abbau der CS findet, wie JOHNSON (1939) und BREUSCH (1939) bei anderen Versuchstieren konstatiert haben, in so gut wie allen Geweben, aber nicht im Blute statt. Auch die roten Blutkörperchen enthalten keine nachweisbare, CS spaltende Enzyme.

Beim Vergleich der CS-Bildung und Eliminierung in den verschiedenen Geweben des Rindes ist festzustellen, dass im Herzmuskel beide Vorgänge in grossem Umfange vorsichgehen. Was den Abbau anbetrifft, ist die Wirkung der Leber noch etwas stärker, aber in der CS-Bildung kann nur das Nierengewebe bis zu einem gewissen Grade mit dem Herzmuskelgewebe konkurrieren. Ausser in diesen beiden Geweben findet aber auch in Leber, Nebennieren und Skelettmuskulatur eine beachtenswerte CS-Synthese statt, wenn als Substrat Brenztraubensäure zusammen mit 4-C-

Dicarbonensäuren hinzugesetzt wird. In den übrigen Geweben ist die CS-Bildung zwar auch deutlich, aber die Zunahme der Säure bei Kombinationsversuchen ist nicht sehr gross. Beachtenswert ist die Tatsache, dass neben dem Herzmuskel auch die anderen Gewebe, welche am meisten CS abbauende Enzyme enthalten, ebenfalls die stärkste Synthese aufweisen. Dies muss irgendeine Bedeutung im Stoffwechsel haben. Das Blut dagegen enthält keine die CS aufbauenden Enzyme; es ist daher anzunehmen, dass die Regulierung des Blutspiegels durch die Gewebe besorgt wird. Interessant ist schliesslich auch die Unfähigkeit des Schilddrüsengewebes CS zu bilden.

Das konstante Vorkommen von CS in den meisten hier untersuchten Geweben ist bisher nicht nachgewiesen worden. Die von mir vorgenommenen Versuche haben gezeigt, dass alle untersuchten Gewebe des Rindes CS enthalten. Nur in Leber, Herzmuskel und Skelettmuskulatur, mit anderen Worten in den Geweben die am meisten CS abbauende Enzyme enthalten, ist weniger CS als im Blute. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen habe ich gefunden, dass Hoden und Eierstöcke ziemlich viel CS enthalten. Besonders interessant ist aber der reichliche CS-Gehalt der Schilddrüse, der den Blutspiegel mehrmals zehnfach übersteigt, umso mehr als die Drüse selbst nicht im Stande ist CS zu bilden. Über die physiologische Bedeutung der CS in der Schilddrüse ist es schwer in diesem Zusammenhang etwas Sicheres auszusagen. Diese Frage bedarf weiterer Untersuchung.

## V. Zusammenfassung.

Die Absicht mit dieser Arbeit war es zu untersuchen, unter welchen Bedingungen die CS-Bildung in-vitro am besten vorsichgeht, welche verschiedenen Verbindungen eine Zunahme derselben hervorrufen und in welchen Geweben dies geschieht. Ferner wurde auch der Abbau der CS unter entsprechenden Bedingungen verfolgt, wobei versucht wurde die in entgegengesetzter Richtung wirkenden Enzyme von einander zu trennen. Schliesslich wurde auch dem Vorkommen der CS in den einzelnen Organen Beachtung geschenkt.

1. Bei den vorgenommenen Untersuchungen erwies sich die kolorimetrische CS-Bestimmungsmethode nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY als besonders geeignet für Gewebe-Versuche. — Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Wasserstoffsuperoxyd besser ist zur Entfernung des überschüssigen Oxydationsmittels als Ferrosulfat. Die Bestimmungsbreite der CS-Konzentration wurde bedeutend erweitert durch Aufstellung von Standardkurven für verschiedene Verdünnungen. — Bei Prüfung einer grossen Zahl von Säuren erwies sich, dass Itaconsäure in 100-facher Menge eine Farbe entsprechend 8 Einheiten CS gibt und Brenztraubensäurealdol in gleicher Menge wie drei Einheiten CS reagiert. Dagegen geben Aconitsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Oxalessigsäure, Buttersäure, Crotonsäure und Brenztraubensäure erst in mannigfach grösseren Konzentrationen eine Farbe. Bei den vorgenommenen Versuchen wurde die störende Wirkung der erwähnten Säuren durch verschiedene Blindproben ausgeschaltet. — Bei Parallelbestimmungen mit der THUNBERG-Methodik gab diese in Gewebesuspensionen durchgehend grössere Werte.

2. Die CS-Bildung in-vitro ist am stärksten unter aeroben Bedingungen, wobei das pH-Optimum zwischen 7.5—8.0 variiert. Bei leicht saurer Reaktion wird CS nur in Gegenwart von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure gebildet, jedoch erhält man hierbei auch anaerob positive Resultate. Andere Säuren geben unter anaeroben Bedingungen bei Zusatz zu Gewebesuspensionen nicht Anlass zur Bildung von CS.

— Die grössten CS-Werte wurden mit Leber nach 15 Minuten, Herzmuskel und Nieren nach 30 Minuten und anderen Geweben nach 60 Minuten Bebrütung im Wärmeschrank von 37° C erhalten. — Die prozentuelle Bildung, bezogen auf die Menge der zugesetzten zu prüfenden Verbindung, wächst mit Abnahme der Substratquantität, besonders bei Versuchen mit Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure. Eine Ausnahme macht die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure. — Mit gekochtem Gewebe kann gar keine CS-Bildung erzielt werden.

3. Von den Gewebsgiften hemmen die Arsenigsäure, Cyanid und Toluol die CS-Bildung, während dagegen Fluorid keinen nennenswerten Einfluss hat ausser in sehr grossen Konzentrationen. — Malonsäure hindert die CS-Synthese aus allen anderen Verbindungen ausser den 4-C-Dicarbonsäuren abgesehen von der Bernsteinsäure; die CS-Bildung aus den zuletzt erwähnten Säuren wird im Gegenteil eher vermehrt durch Malonsäure.

4. Zu stärkerer CS-Bildung als bei nur alkalischer Reaktion kommt es durch Zusatz von Milchsäure, Brenztraubensäure, *n*-Buttersäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, l-Äpfelsäure, Oxalessigsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Citraconsäure und Brenztraubensäurealdol zu den Gewebesuspensionen. Was speziell den zuletzt erwähnten Brenztraubensäurealdol anbelangt, gibt er eine viel schlechtere CS-Ausbeute als Brenztraubensäure. Auch die Mesoxalsäure, iso-Buttersäure, Crotonsäure, Weinsäure (inaktiv), Glutarsäure und Adipinsäure rufen eine Zunahme der CS-Bildung hervor, wenn auch in viel geringerem Masse. Ganz ohne Wirkung sind dagegen Acetaldehyd, Essigsäure, Glycolsäure, Propionsäure, Gluconsäure, Malonsäure, Tartronsäure, l-Weinsäure, Acetondicarbonsäure, Itaconsäure, Tricarbaldehyd,  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure und Glucose. Von den Aminosäuren wirkt weder die l- noch die d,l-Glutaminsäure, dagegen steigert die Asparaginsäure die CS-Bildung und zwar sonderbarerweise die dem Organismus fremde d,l-Form mehr als die reine l-Form.

5. Von den untersuchten Geweben kommt es bei Zusatz der zuerst erwähnten Säuren-Gruppe zur CS-Bildung in Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskel, Testis, Nebennieren, Gehirn, Thymus, Lungen, Leber und Milz. In der Schilddrüse, im Blut und in den roten Blutkörperchen wird aber gar keine CS gebildet.

6. Im allgemeinen erhält man die stärkste CS-Bildung mit Oxalessigsäure mit Ausnahme des Herzmuskels, in dem aus l-Äpfelsäure mehr gebildet zu werden scheint. Nach Waschen des Herzmuskelgewebes verhält sich dieses Gewebe aber wie die anderen. In

Herzmuskel, Leber und Milz wird ebenfalls mehr CS nach Zugabe von  $\alpha$ -Ketoglutar säure als von Oxalessigsäure gebildet. Auch in den übrigen Geweben verhält sich die  $\alpha$ -Ketoglutar säure mehr wie die erste Säure der Dehydrierungsreihe der 4-C-Dicarbonsäuren, die Oxalessigsäure, als wie die letzte, die Bernsteinsäure. Die Stellung der Brenztraubensäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und n-Buttersäure in der Reihenfolge ihrer Wirkungsgrösse nach variiert etwas in den verschiedenen Geweben. Mit Ausnahme von Versuchen in Nierengewebe ist die erste Säure regelmässig viel effektiver als die beiden anderen, deren Reihenfolge die Obige ist. Ausser in Leber, Gehirn und Nieren ist aber die CS-Bildung aus den beiden letzteren Säuren viel schwächer als aus allen anderen. Die d,l-Asparaginsäure hat ungefähr eine ebenso starke Wirkung wie die Fumarsäure und l-Äpfelsäure. — Trotz zahlreicher Versuche konnte eine Zunahme der CS-Bildung durch Acetondicarbonsäure in keinem Gewebe festgestellt werden.

7. Bei Zusatz von Brenztraubensäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Milchsäure zusammen mit 4-C-Dicarbonsäuren wird mehr CS gebildet als von jeder der erwähnten Säuren allein. Ähnlich verhält sich auch die Essigsäure, aber nur im Herzmuskel; auch ist ihre Wirkung im Vergleich zu den anderen Säuren sehr gering. Die  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, Mesoxalsäure, n-Buttersäure, Glycolsäure, Oxalsäure und der Acetaldehyd geben dagegen ein negatives Ergebnis auch bei Kombinationsversuchen.

8. Besonders stark ist die Wirkung der 4-C-Dicarbonsäuren zusammen mit Brenztraubensäure im Herzmuskel und in Nierengewebe. Berechnet man den Durchschnittswert der CS-Bildung der Gewebe aus Fumarsäure, l-Äpfelsäure und Oxalessigsäure zusammen mit Brenztraubensäure erhält man folgende Reihenfolge: Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskulatur, Nebennieren, Testis, Gehirn, Thymus, Lungen, Milz, Leber und Schilddrüse. In dem zuletzt genannten Gewebe erhält man ebenso, wie mit hämolysiertem oder nicht-hämolysiertem Blut, überhaupt keine positiven Resultate.

9. Im allgemeinen ruft in Kombinationsversuchen die Oxalessigsäure die stärkste Steigerung der CS-Bildung hervor, die  $\alpha$ -Ketoglutar säure, die Vorstufe der Bernsteinsäure dagegen die schwächste. Eine Ausnahme bildet jedoch der Herzmuskel, in dem, genau wie bei den Versuchen mit einzelnen Säuren, die l-Äpfelsäure stärker wirkt. Auch hier ändert sich das Verhältnis nach Waschen des Gewebes. — Die Gewebsgifte verhalten sich bei den Kombinationsversuchen wie bei den Versuchen mit nur einer Säure. Die hemmende Wirkung der Malonsäure bei Versuchen mit Brenz-

traubensäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure wird jedoch durch die 4-C-Dicarbonsäuren aufgehoben.

10. Die grösste CS-Menge, welche Gewebe mit dem stärksten Bildungseffekt, also Herzmuskelgewebe, aus Brenztraubensäure und l-Äpfelsäure als Ausgangsstoffe synthetisieren konnten, war *0.0084 g CS pro 1 g Gewebe entsprechend einer 0.225 % Lösung*. Optimal wurde bis zu 69 % der Ausgangsverbindungen als CS erhalten. In den optimalen Kombinationsversuchen wurde mehr CS gebildet als die zugesetzte Menge jedes Ausgangsstoffes für sich betrug. In den verschiedenen Geweben entstand ausserdem am meisten CS bei Zusatz der einzelnen 4-C-Dicarbonsäuren in verschiedenem Mengenverhältnis.

11. Die  $\beta$ -Oxybuttersäure gibt zusammen mit den 4-C-Dicarbonsäuren positive Ergebnisse in Leber, Nieren, Herzmuskel und Skelettmuskel und zusammen mit Oxalessäure auch in den anderen untersuchten Geweben.

12. Im Gewebe des Rindes verschwindet die CS aerob etwas schneller als anaerob und zwar in den verschiedenen Geweben in folgender Reihenfolge: Leber, Herzmuskel, Nieren, Skelettmuskulatur, Lungen, Gehirn, Testis, Schilddrüse, Thymus, Nebennieren und Milz. Im Blut, auch im hämolysierten, verschwindet die CS nicht.

13. Arsenigsäure und Fluorid verhindern nicht den CS-Abbau, dagegen scheinen dies Cyanid und Malonsäure in gewissem Grade zu tun. Toluol hat keine sichere Wirkung. In Suspensionen, die nur CS abbauende Enzyme enthalten, rufen auch die Vorläufer der CS keine Verminderung des Abbaus hervor.

14. Die bekannten Dehydrasepräparate enthalten gar keine synthetisierenden Enzyme. Durch Alkohol-, Äther- oder Acetonbehandlung werden sie völlig zerstört. Bei Extraktion mit Pufferlösungen sind sie nicht aus dem Gewebe zu entfernen, an das sie allen Ansehen nach sehr fest gebunden sind. Nach wiederholtem Waschen der Gewebe kommt die CS-Bildung, besonders in Kombinationsversuchen am deutlichsten zum Vorschein, da der überwiegende Teil der abbauenden Enzyme jetzt weggelöst ist. Sowohl die auf- als auch die abbauenden Enzyme der CS scheinen sich in kalter Umgebung recht gut zu halten.

15. Milchdrüse, Schilddrüse, Testis, Eierstöcke, Gehirn, Lungen, Nebennieren, Bauchspeicheldrüse, Thymus, Nieren, Milz, Parotis, Skelettmuskulatur, Herzmuskel und Leber enthalten CS in der angeführten Reihenfolge. Die drei zuletzt genannten Gewebe haben einen CS-Gehalt, der kleiner ist als der Blutspiegel. Besonders beachtenswert ist der hohe CS-Gehalt der Schilddrüse (29.5—123.0 mg %).

## VI. Literaturverzeichnis.

- ABDERHALDEN, E. und WERTHEIMER, E.: Pflügers Arch. 1921. 191: 258.  
ref. nach Chem. Zbl. 1921. I: 424.
- ADLER, E., EULER, H. v., GÜNTHER, G. und PLASS, M.: Biochem. J.  
1939, 33: 1028.
- AMBERG, S. und MAYER, M. E.: J. biol. Chem. 1921. 46: 15.
- AMBERG, S. und Mc CLURE, W. B.: Amer. J. Physiol. 1917. 44: 453.
- ANNAU, E.: Z. physiol. Chem. 1934. 224: 141.
- ANNAU, E.: Ebenda 1938. 253: 127.
- ANNAU, E., BANGA, I., GÖSZY, B., HUSZÁK, S., LAKI, K., STRAUB, F. B.,  
SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Ebenda 1935. 236: I.
- ANNAU, E., BANGA, I., BALAZSÓ, A., BRUCHNER, V. L. K., STRAUB, F. B.,  
SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Ebenda 1936. 244: 105.
- ANNAU, E. und ERDÖS, T.: Ebenda 1938. 257: 111.
- ANNAU, E. und STRAUB, F. B.: Ebenda 1937. 247: 252.
- AXMAGHER, F. und SÜLLMANN, H.: Schweiz. med. Wschr. 1932: 236.
- BANGA, I.: Z. physiol. Chem. 1935. 236: 20.
- BANGA, I.: Ebenda 1936. 244: 130.
- BANGA, I., OCHOA, S. und PETERS, R. A.: Biochem. J. 1939. 33: 1109.
- BANGA, I., SCHNEIDER, L. und SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Z. physiol. Chem.  
1931. 240: 462.
- BANGA, I. und SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Ebenda 1936. 245: 113.
- BARTELS, W.: Z. Unters. Lebensmittel. 1933. 65: 1.
- BATTELLI, F. und STERN, L.: Biochem. Z. 1911. 31: 478.
- BAUR, E.: Naturw. 1913. 1: 474.
- BEAU, M.: Rev. génér. du lait. 1904: 585. ref. nach Malys Jhrb. Tierchem.  
1904. 34: 281.
- BEAU, M. und DUNNBARR, P. B.: J. Ind. Enz. Chem. 1911. 3: 930. ref.  
nach Chem. Zbl. 1912. 1: 270.
- BENNI, B.: Biochem. Z. 1930. 221: 270.
- BERNHAEUER, K.: Ebenda 1928. 197: 309.
- BERNHAEUER, K.: Grundzüge der Chemie und Biochemie der Zuckerarten  
1933: 242.
- BERNHAEUER, K. und BÖCKL, N.: Biochem. Z. 1932. 253: 215.
- BERNHAEUER, K., BÖCKL, N. und SIEBENÄUGER, H.: Ebenda 1932. 253: 16.
- BERNHAEUER, K. und SCHEUER, Z.: Ebenda 1932. 253: 11.
- BERNHAEUER, K. und SIEBENÄUGER, H.: Ebenda 1931. 240: 232.
- BERNHEIM, F.: Biochem. J. 1928. 22: 1178.



- BLEYER, B. und SCHWAIBOLD, J.: *Milchwirtsch. Forsch.* 1925. II: 260.
- BOOTHBY, W. M. und ADAMS, M.: *Amer. J. Physiol.* 1934. 107: 471.
- BOSWORTH, A. V. und PRUCHA, M. J.: *J. biol. Chem.* 1911. 8: 479.
- BOYLAND, E. und BOYLAND, M. E.: *Biochem. J.* 1936. 30: 224.
- BRAUNSTEIN, A. E.: *Enzymologia (Nd.)* 1939. 7: 25.
- BRAUNSTEIN, A. E. und KRITZMANN, M. G.: *Nature (Brit.)* 1937. 140: 503.
- BRAUNSTEIN, A. E. und KRITZMANN, M. G.: *Enzymologia (Nd.)* 1937. 2: 129.
- BREUSCH, F. L.: *Z. physiol. Chem.* 1937. 250: 262.
- BREUSCH, F. L.: *Biochem. Z.* 1937. 295: 101.
- BREUSCH, F. L.: *Biochem. J.* 1939. 33: 1757.
- BROECKSMITH, T. C. N.: *Pharmaceut. Wbl.* 1904. 41: 401. ref. nach *Chem. Zbl.* 1904. I: 1657.
- BUCHNER, E. und WÜSTENFELD, H.: *Biochem. Z.* 1909. 17: 395.
- BUTKEWITSCH, W.: *Ebenda* 1923. 142: 195.
- BUTKEWITSCH, W.: *Ebenda* 1924. 154: 177.
- BUTKEWITSCH, W. und FEODOROFF, M. W.: *Ebenda* 1929. 207: 302.
- BUTKEWITSCH, W. und FEODOROFF, M. W.: *Ebenda* 1930. 219: 87.
- BUTTERWORTH, E. C. und WALKER, T. K.: *Biochem. J.* 1929. 23: 103.
- BUTTERWORTH, E. C. und WALKER, T. K.: *Ebenda* 1929. 23: 926.
- CHALLENGER, F., SUBRAMANIAM, V. und WALKER, T. K.: *J. Chem. Soc. (London)* 1927: 3044. ref. nach *Chem. Zbl.* 1927. I: 2561.
- CHALLENGER, F., SUBRAMANIAM, V. und WALKER, T. K.: *Ebenda* 1927: 200. ref. nach *Chem. Zbl.* 1927. II: 841.
- CHALLENGER, F., SUBRAMANIAM, V. und WALKER, T. K.: *Nature (Brit.)* 1928. 121: 244.
- CHRSZASZCS, T. und TIUKOW, D.: *Biochem. Z.* 1930. 229: 343.
- CHRSZASZCS, T. und TIUKOW, D.: *Ebenda* 1931. 242: 137.
- CHRSZASZCS, T., TIUKOW, D. und ZAKOMORNY, M.: *Ebenda* 1932. 250: 254.
- CLAISEN, L. und HORI, E.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1891. 24: 120.
- COHEN, P. P.: *Biochem. J.*: 1939. 33: 1478.
- COMMETIANI, P.: *Z. anal. Chem.* 1931. 86: 362.
- DAKIN, D. H.: *J. biol. Chem.* 1923. 52: 183.
- DAKIN, D. H. und DUDLEY, H. W.: *Ebenda* 1914. 18: 29.
- DENIGÈS, G.: *Z. anal. Chem.* 1901. 40: 121.
- DICKENS, F.: *Chem. and Ind.* 1940. 59: 135 ref. nach MÄRTENSSON, J.: *Acta physiol. scand.* 1940. 2. Suppl. 2.
- DIEUDONNÉ: *Sitzungsber. physik.-mediz. Gesellsch. zu Würzburg* 1903. 99 ref. nach ÖSTBERG, O. 1931.
- DUCLAUX, M.: *Ann. Inst. Pasteur, Par.* 1893. 7: 2.
- EDSON, N. L.: *Biochem. J.* 1935. 29: 2082.
- EHRlich, F.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1919. 52: 63.
- EINBECK, H.: *Biochem. Z.* 1919. 95: 296.
- EMBDEN, G. und OPPENHEIMER, M.: *Ebenda* 1912. 45: 186.
- EMBDEN, G. und SCHMITZ, E.: *Ebenda* 1910. 29: 423.
- EMBDEN, G. und SCHMITZ, E.: *Ebenda* 1912. 38: 393.
- EULER, H. v.: *Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie* 1909. 3: 182.

- EULER, H. v., ADLER, E., GÜNTHER, G. und DAS, N. B.: Z. physiol. Chem. 1938. 254: 61.
- FALCK, R.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1924. 57: 920.
- FASOLD, O.: Z. Biol. 1930. 90: 192.
- FASOLD, O.: Z. Kinderhk. 1930. 49: 709.
- FELIX, K., ZORN, K. und DIRR-KALTENBACH, H.: Z. physiol. Chem. 1937. 247: 141.
- FRANZEN, H. und SCHMITT, F.: Ber. deutsch. Chem. Ges. 1925. 58: 222.
- FÜRTH, O., MINNIBECK, H. und EDEL, E.: Biochem. Z. 1934. 269: 379.
- GREEN, D. E.: Biochem. J. 1936. 30: 2095.
- GREENWALD, I.: J. biol. Chem. 1926. I: 67.
- GENNIL, C. L.: Skand. Arch. Physiol. 1934. 67: 201.
- GREVILLE, D. G.: Biochem. J. 1936. 30: 877.
- GREY, E. C.: Proc. roy. Soc. (London) 1924. 96: 156. ref. nach Chem. Zbl. 1924. II: 1358.
- GÖSZY, B. und SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Z. physiol. Chem. 1934. 226: I.
- GRÖNVALL, H.: Acta ophthalm. 1937. Suppl. 14.
- HAHN, A.: Z. Biol. 1930. 89: 332.
- HAHN, A. und HAARMANN, W.: Ebenda 1928. 87: 465.
- HAHN, A. und HAARMANN, W.: Ebenda 1929. 89: 332.
- HAHN, A., HAARMANN, W. und FISCHBACH, E.: Ebenda 1929. 88: 587.
- HALLMAN, N.: Suom. Kemistil. (Acta chem. fenn.). 1938. B 11: 23.
- HALLMAN, N.: Ebenda 1939. B 12: 18.
- HALLMAN, N. und SIMOLA, P. E.: Ebenda 1938. B 11: 18.
- HALLMAN, N. und SIMOLA, P. E.: Science 1939. 90: 594.
- HANZSCH, A.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1915. 48: 1415.
- HARRISON, D. C.: Biochem. J. 1931. 25: 1011.
- HASTINGS, A. B., MURRAY, C. D. und SENDROY, J.: J. biol. Chem. 1926 —27. 71: 723.
- HÄUSSLER, P. E.: Chem.-Ztg. 1914. 38: 937.
- HENKEL, T.: Chem. Zbl. 1888: 1561.
- HERZOG, R. O. und POLOTZKY, A.: Z. physiol. Chem. 1909. 59: 125.
- HUGGINS, C. B. und HASTINGS, A. B.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1933. 30: 459. ref. nach Chem. Zbl. 1933. II: 2692.
- JERLOV, E.: Sv. Läkartidn. 1929. 26: 758.
- JOHNSON, W. A.: Biochem. J. 1939. 33: 1046.
- JORRISEN, A. M.: Bull. Acad. Med. Belg., Brux. 1919: 731. ref. nach Chem. Zbl. 1921. II: 536.
- KEILIN, D. und HARTREE, E. F.: Proc. roy. Soc. Lond. 1936. 119: 114. ref. nach Chem. Zbl. 1936. I: 489.
- KILIANI, H.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1904. 37: 1201.
- KLEIN, G. und WERNER, O.: Z. physiol. Chem. 1925. 143: 141.
- KNOOP, F.: Z. physiol. Chem. 1910. 67: 489.
- KNOOP, F.: Oxydationen im Tierkörper 1931.
- KNOOP, F. und KERTESS, E.: Z. physiol. Chem. 1911. 71: 252.
- KNOOP, F. und MARTIUS, O.: Ebenda 1936. 242: I.

- KNOOP, F. und OESTERLIN, H.: *Ebenda* 1925. 148: 294.
- KNOOP, F. und OESTERLIN, H.: *Ebenda* 1927. 170: 186.
- KNOOP, F. und WINDAUS, A.: *Beitr. chem. Physiol. und Path.* 1905. 6: 394. ref. nach BUCHNER, E. und WÜSTENFELD, H. 1909.
- KOGAN, A. J.: *Z. anal. Chem.* 1930. 80: 112.
- KOSTYSCHEW, S. und TSCHESNOKOW, W.: *Planta* 1927. 4: 181.
- KREBS, H. A.: *Z. physiol. Chem.* 1933. 217: 191.
- KREBS, H. A.: *Ebenda* 1933. 218: 157.
- KREBS, H. A.: *Biochem. J.* 1935. 29: 1620.
- KREBS, H. A.: *Annual. Rev. Biochem.* 1936. 5: 247.
- KREBS, H. A. und COHEN, P. P.: *Biochem. J.* 1938. 33: 1895.
- KREBS, H. A. und EGGLESTON, L. V.: *Ebenda* 1937. 32: 913.
- KREBS, H. A. und JOHNSON, A. W.: *Ebenda* 1937. 31: 645.
- KREBS, H. A. und JOHNSON, A. W.: *Enzymologia (Nd.)* 1937. 4: 148.
- KREBS, H. A., SALVIN, E. und JOHNSON, H. A.: *Biochem. J.*: 1938. 32: 113.
- KRUSIUS, F.-E.: *Acta physiol. scand.* 1940. 2. Suppl. 3.
- KRUSIUS, F.-E. und VESA, A.: *Acta Soc. Medic. fenn. Duodecim.* 1939. 21: 3.
- KRITZMANN, M.: *Enzymologia (Nd.)* 1938. 5: 44.
- KUYPER, A. C. und MATTILL, A. H.: *J. biol. Chem.* 1933. 100: 61.
- KUYPER, A. C. und MATTILL, A. H.: *Ebenda* 1933. 103: 54.
- LAKI, K.: *Z. physiol. Chem.* 1936. 244: 142.
- LANGHECKER, H.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* 1933. 171: 744.
- LANGHECKER, H.: *Biochem. Z.* 1934. 273: 43.
- LEANE, G.: *Riforme med.* 1922. 38: 313. ref. nach *Chem. Zbl.* 1922. II: 739.
- LEVI, A.: *Bel. Soc. Med. Cir. Modena.* 1928. 29: 29. ref. nach ÖSTBERG, O. 1931.
- LINDHOLM, H.: *Scand. Arch. Physiol.* 1934. 70: 295.
- LIPMANN, F.: *Ebenda* 1937. 76: 193.
- LOEB, A.: *Biochem. Z.* 1912. 47: 118.
- MAGNUSSON, L.: *Acta paediatr.* 1932. 13: 345.
- MALACHOWSKI, R. und MASŁOWSKI, M.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1928. 61: 2521.
- MARTIUS, C.: *Z. physiol. Chem.* 1937. 247: 104.
- MARTIUS, C.: *Ebenda* 1938. 257: 29.
- MARTIUS, C. und KNOOP, F.: *Ebenda* 1937. 246: I.
- MAYER, P.: *Biochem. Z.* 1914. 62: 462.
- MAZÉ, P. und PERRIÉR, A.: *C. r. l'acad. Science.* 1904. 139: 311. ref. nach *Chem. Zbl.* 1904. II: 717.
- Mc CLURE, D. W. und SAUER, L. W.: *Amer. J. Physiol.* 1922. 62: 140.
- MERK, B.: *Pharmaz. Ztg.* 1904. 48: 894. ref. nach *Chem. Zbl.* 1904. II: 1.
- MEYER, K. H.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1912. 45: 2861.
- MÜLLER, D.: *Biochem. Z.* 1935. 275: 347.

- MULLI, K. und STANDENATH, F.: *Klin. Wschr.* 1933. 12: 544. ref. nach ÖSTBERG, O. 1931.
- MÄRTENSSON, J.: *Skand. Arch. Physiol.* 1938. 80: 304.
- MÄRTENSSON, J.: *Ebenda* 1939. 83: 113.
- NEBER, M.: *Z. physiol. Chem.* 1935. 234: 83.
- NEBER, M.: *Ebenda* 1936. 240: 59.
- NEUHOFF, H. und HIRSCHFELD, S.: *Ann. Surg.* 1922. 76: 1. ref. nach ÖSTBERG, O. 1931.
- NEUBAUER, O. und GROSS, W.: *Z. physiol. Chem.* 1910. 67: 219.
- NITZESCU, L. I. und GEORGESCU, I. D.: *C. r. l'acad. Scienc.* 1930. 190: 1325. ref. nach *Chem. Zbl.* 1930. II: 1230.
- NORDBÖ, R. und SCHERSTÉN, B.: *Skand. Arch. Physiol.* 1931. 63: 124.
- OBERMAIER, G.: *Arch. Hyg.* 1904. 50: 52.
- OHTA, K.: *Biochem. Z.* 1912. 44: 481.
- ORTEN, J. M. und SMITH, A. H.: *J. biol. Chem.* 1937. 117: 555.
- ORTEN, J. M. und SMITH, A. H.: *Ebenda* 1938. 124: 43.
- ORTEN, J. M. und SMITH, A. H.: *Ebenda* 1939. 128: 101.
- ÖSTBERG, O.: *Biochem. Z.* 1930. 226: 162.
- ÖSTBERG, O.: *Skand. Arch. Physiol.* 1931. 62: 81.
- PICKERING, J. W. und HEWITT, J. A.: *Amer. J. Physiol.* 1925. 59: 426.
- PICKERING, J. W. und SANZA, D. DE: *Biochem. J.* 1924. 17: 747.
- POHL, J.: *Arch. exper. Path.* 1896. 37: 412.
- PRATT, W. R.: *Soc. Unit. Stat. Dep. Agric. Circ.* 1912. 88: 1. ref. nach SCHERSTÉN, B. 1936.
- PUCHER, G. W., SHERMAN, C. C. und VICKERY, H. B.: *J. biol. Chem.* 1936. 113: 235.
- QUASTEL, J. H.: *Biochem. J.* 1926. 20: 166.
- QUASTEL, J. H. und WOOLDRIDGE, W. R.: *Ebenda* 1929. 22: 689.
- RAISTRICK, H. und CLARCK, A. B.: *Ebenda* 1919. 13: 329.
- REICHEL, L. und NEEF, A.: *Naturw.* 1935. 23: 391.
- ROSENTHAL, N. und BAHR, G.: *Ber. Physiol.* 1923. 18: 360.
- ROSENTHALER, L.: *Arch. Pharm.* 1903. 241: 479. ref. nach *Chem. Zbl.* 1903. II: 1025.
- SALANT, W. und WISE, L. E.: *J. biol. Chem.* 1916. 28: 27.
- SANZA, D. DE und HAERING, F. D.: *J. Physiol.* 1935. 85: 168.
- SANZA, D. DE und HAERING, F. D.: *Ebenda* 1935. 85: 173.
- SCHERSTÉN, B.: *Skand. Arch. Physiol.* 1929. 52: 90.
- SCHERSTÉN, B.: *Nord. Kongr. Physiol. Kopenhagen.* 1931.
- SCHERSTÉN, B.: *Skand. Arch. Physiol.* 1936. 74: Suppl. 7.
- SCHROBER, R.: *Jber. Biol.* 1931. 72: 1. ref. nach BERNHAUER, K. 1933.
- SCHUCK, C. J.: *Nutrition.* 1934. 7: 679. ref. nach *Chem. Zbl.* 1934. II: 1802.
- SCHUCK, C. J.: *Ebenda* 1934. 7: 691. ref. nach *Chem. Zbl.* 1934. II: 1802.
- SHERMAN, C. C., MENDEL, L. B. und SMITH, A.: *J. biol. Chem.* 1936. 113: 247.
- SHORR, E. und BARKER, S. B.: *Biochem. J.* 1939. 33: 1798.
- SHIPLEY, P. G., KRAMER, B. und HOWLAND, J.: *Biochem. J.* 1926. 20: 379.
- SIMOLA, P. E.: *Skand. Arch. Physiol.* 1938. 80: 375.

- SIMOLA, P. E.: Acta med. scand. 1938. Suppl. 90.  
SIMOLA, P. E.: Suom. Kemistil. (Acta chem. fenn.) 1938. B 12: 10.  
SIMOLA, P. E. und ALAPEUSO, H.: Ebenda 1938. B 11: 17.  
SIMOLA, P. E. und ALAPEUSO, H.: Ebenda 1939. B 12: 9.  
SIMOLA, P. E., HALLMAN, N. und ALAPEUSO, H.: Ebenda 1930. B 12: 10.  
SIMOLA, P. E. und KOSUNEN, T.: Ebenda 1938. B 12: 1938.  
SIMOLA, P. E. und KRUSIUS, F.-E.: Z. physiol. Chem. 1939. 261: 209.  
SIMOLA, P. E., KRUSIUS, F.-E. und ALAPEUSO, H.: Suom. Kemistil. (Acta chem. fenn.). 1938. B 11: 18.  
SIWE, S.: Scand. Arch. Physiol. 1938. 80: 385.  
SJÖSTRÖM, P. M.: Acta chir. scand. 1937. 79: 105.  
SMITH, A. H. und MEYER, C. E.: J. biol. Chem. 1939. 131: 45.  
SMITH, A. H., ORTEN, J. M., JOHNSTON, C. G. und BANGUESS, L. C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1939. 42: 288.  
SOXHLET, L.: Chem. Zbl. 1888. I: 1067.  
SONDERHOFF, R.: Liebigs Ann. 1936. 525: 132.  
SPICA, M.: Chem. Ztg. 1910. 34: 1141. ref. nach Chem. Zbl. 1910. II: 1724.  
STAHR, L.: Z. anal. Chem. 1897. 36.  
STRAUB, F. B.: Z. physiol. Chem. 1936. 244: 140.  
SÜLLMANN, H. und SCHAEFER, G.: Schweiz. med. Wschr. 1932. 13: 619.  
SZENT-GYÖRGYI, A. v.: Studies on Biological Oxidation and some of its Catalysts, 1937.  
TÄUFEL, K. und MAYR, F.: Z. anal. Chem. 1933. 93: I.  
TERADA, J.: Pharmaceut. Soc. Jap. 1924. 511: 697. ref. nach BERNHAUER, K. 1933.  
THUNBERG, T.: Skand. Arch. Physiol. 1910. 24: 57.  
THUNBERG, T.: Ebenda 1920. 35: 163.  
THUNBERG, T.: Biochem. Z. 1929. 206: 109.  
THUNBERG, T.: Abderhaldens Handbuch für Biologische Forschungsmethoden 1933. IV, 2: 2017.  
THUNBERG, T.: Acta path. scand. 1933. 16: 535.  
VAUDIN, M. L.: Le Laiterie. 1897: 51. ref. nach Chem. Zbl. 1897. II: 1056.  
VIRTANEN, A. I. und PULKKI, O.: Ann. Acad. Scand. Fenn. 1930. 23 A.  
WAGNER-JAUREGG, T. und RAUEN, H.: Z. physiol. Chem. 1935. 237: 227.  
WEHMER, C.: C. r. 1893, 117: 332. ref. nach Chem. Zbl. 1893: 457.  
WEHMER, C.: Chem. Ztg. 1913. 37: 1893. ref. nach BERNHAUER, K. 1933.  
WEIL-MALHERBE, H.: Biochem. J. 1936. 30: 665.  
WIELAND, H.: Liebigs Ann. 1924. 436: 231.  
WIELAND, H. und SONDERHOFF, R.: Ebenda 1932. 499: 213.  
WILLAMAN, J. J.: J. Amer. chem. Soc. 1916. 38: 2193. ref. nach SCHERSTÉN, B. 1936.  
WOHL, A. und CLAUSNER, P.: Ber. dtsh. chem. Ges. 1907. 40: 2309.  
WOHL, A. und OESTERLIN, C.: Ebenda 1901. 34: 1145.  
WÖHLK, A.: Z. anal. Chem. 1902. 41: 77.  
WOODS, E. B.: Amer. J. Physiol. 1926—27. 79: 77.
-

ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA  
VOL. 2. SUPPLEMENTUM V.

---

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Lund und aus  
dem Zentrallaboratorium des Sahlgrenschen Krankenhauses  
in Göteborg, Schweden

STUDIEN ÜBER  
UMSATZ UND WIRKUNGEN DER  
BERNSTEINSÄURE IN VIVO

NEBST EINER MIKROMETHODE ZUR BESTIMMUNG  
VON BERNSTEINSÄURE

VON

SVEN FORSSMAN

---

LUND

## Berichtigungen.

- S. 10, Z. 21 von oben, statt Fumarsäure lies Bs- Fumarsäure.  
S. 39, Z. 19 von oben, statt S. 421 lies S. 41  
S. 40, Z. 7 von unten, statt von grösster Bedeutung. Fleisch von lies von grösster Bedeutung, Fleisch von.  
S. 48, Z. 4 von oben, statt  $\Sigma_M$  lies  $\xi_M$ .  
S. 76, Z. 4 von unten, statt A' (80 %) lies A' (20 %).  
S. 76, Z. 4 von unten, statt B' (42 %) lies B' (58 %).  
S. 95, Z. 13 von oben, statt gemacht lies bestimmt.  
S. 118, zwischen Z. 7 und Z. 8 ist einzufügen: EINBECK, H., Z. physiol. Chem. 1913, 87, 145.
-

*MEINEN ELTERN*





## Vorwort.

Die vorliegende, im März 1938 begonnene Untersuchung ist im Pharmakologischen Institut der Universität Lund und im Zentrallaboratorium des Sahlgrenschen Krankenhauses in Göteborg ausgeführt worden. Den Direktoren der beiden Institute, Herrn Professor Dr. GUNNAR AHLGREN, Lund, und Herrn Professor Dr. JÖRGEN LEHMANN, Göteborg, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet. Sie haben mich in dieses Arbeitsgebiet eingeführt, meine Arbeit mit Rat und Tat unterstützt und mir an ihren Instituten ausserordentliche Arbeitsmöglichkeiten geschaffen.

Herrn Professor Dr. TORSTEN THUNBERG hat meine Arbeit mit stetem Interesse verfolgt. Hierfür und namentlich für seine wertvollen Ratschläge spreche ich ihm meinen wärmsten Dank aus.

Herrn Med. lic. OLE BERG danke ich herzlich für fruchtbringende und anregende Diskussionen im Zusammenhang mit meiner Arbeit.

Sämtlichen Mitarbeitern am Pharmakologischen Institut danke ich für Ratschläge und technische Hilfe, besonders Fräulein INGRID BENGTTSSON. Für die deutsche Übersetzung danke ich Herrn ERNST BLAUERT, Lund.

Geldliche Förderung erfuhren meine Untersuchungen durch Stiftelsen Therese och John Anderssons Minne, Stockholm, und Kungl. Fysiografiska Sällskapet i Lund, wofür ich meinen geziemenden Dank sage.

Meine Frau hat mir die ganze Zeit die beste Hilfe geleistet, sowohl durch ihre gewissenhaften Analysen als bei den Tierversuchen. Ihre unermüdliche Mitarbeit war mir von unschätzbarem Wert.

Lund, im März 1941.

*Sven Forssman.*



## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<i>Kapitel I. Literaturübersicht und Zielsetzung</i> .....	1
Bernsteinsäure als Metabolit .....	2
Bernsteinsäure als Katalysator .....	9
Zielsetzung der Arbeit .....	23
Anlage der Arbeit .....	23
<i>Kapitel II. Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Bernsteinsäure</i> .....	25
Das Prinzip der neuen Methode .....	28
Reagenzien und Lösungen .....	30
Ausführung der Bestimmung .....	32
Standardisierung der Versuchsbedingungen .....	34
Die Genauigkeit der Bernsteinsäurebestimmung .....	47
Spezifität .....	49
Methodische Probleme aus Anlass der obigen Befunde .....	53
Anwendung der Methode auf biologisches Material .....	58
Die verschiedenen Modifikationen der Bernsteinsäurebestimmung und ihre Anwendung .....	62
Ausführung der verschiedenen Modifikationen der Bernsteinsäure- bestimmung .....	63
<i>Kapitel III. Die Hemmung der Bernsteinsäure-Dehydrierung und der Fumarsäure-Hydrierung durch Malonsäure</i> .....	68
<i>Kapitel IV. Beitrag zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen der Bernsteinsäure</i> .....	79
<i>Kapitel V. Die Umsetzung der Bernsteinsäure in vivo</i> .....	83
Literaturübersicht und Anlage der Untersuchung .....	83
Methodik .....	84
Normalwerte .....	85
Elimination der Bernsteinsäure beim ganzen Tier .....	86
Die Bernsteinsäureelimination verschiedener Organe .....	87
Die Bernsteinsäurebildung des ganzen Tieres .....	94
Die Bernsteinsäurebildung in verschiedenen Organen .....	102
Untersuchung der Bernsteinsäureumsetzung bei der Katze .....	106

	Seite
Die Bernsteinsäureumsetzung und der Tagesrhythmus .....	107
Besprechung der Ergebnisse .....	110
Zusammenfassung .....	113
Summary .....	115
Literaturverzeichnis .....	117

---

## KAPITEL I.

### Literaturübersicht und Zielsetzung.

Die Kenntnis der Bernsteinsäure (hier abgekürzt = Bs) als Stoffwechselprodukt geht auf PASTEUR (1869) zurück, der zeigen konnte, dass bei der normalen alkoholischen Gärung Bs gebildet wird. Was das Vorkommen von Bs bei höheren Tieren, so bei den Säugern, angeht, war man lange der Ansicht, die Säure komme normal nicht in den Geweben vor, sondern werde bei Fäulnis als Bakterienprodukt gebildet. Man fand indessen in Liebigs Fleischextrakt ziemlich reichliche Mengen Bs, und mehrere Forscher vertraten seitdem entschieden die Ansicht, dass Bs *normal* in Muskulatur vorkomme. Mit der Zeit wurde auch festgestellt, dass Bs (in niedriger Konzentration) ein normaler Bestandteil der Muskulatur und anderer Gewebe mehrerer Säuger ist (Literatur siehe BLUMENTHAL 1894, EINBECK 1913, MOYLE 1924, MASSART u. VAN GREMBERGEN 1938).

Die moderne Bs-Forschung wurde damit eingeleitet, dass THUNBERG (1909) die Einwirkung von Bs auf die Atmung überlebender Muskulatur nachwies. Die Untersuchungen, die seither über Bs und ihre Rolle im Stoffwechsel ausgeführt worden sind, lassen sich wegen ihrer grossen Zahl und ihres Umfangs kaum übersehen. Literaturzusammenstellungen findet man bei v. EULER (1934), OPPENHEIMER (1939), NORD u. WEIDENHAGEN (1940). Siehe auch die Übersichten in den Ergebnissen der Enzymforschung Bd. 1—8, 1932—1939 und Ann. Review of biochemistry Bd. 1—9, 1932—1940.

Hinsichtlich der Rolle, die die Bernsteinsäure im Stoffwechsel des Vertebratenorganismus spielt, bestehen zur Zeit zwei Theorien<sup>1</sup>. Nach der einen ist Bs ein *Metabolit*, d. h. ein Glied des

---

<sup>1</sup> Der Bs-Stoffwechsel anderer Organismen (wie Pilze, Bakterien, Pflanzen) wird hier nicht behandelt. Literatur hierüber geben die obengenannten Zusammenstellungen an.

intermediären Stoffwechsels. Nach der andern dient Bs als *Katalysator* bei der Gewebsoxydation, beim Transport des Wasserstoffs von den Wasserstoffdonatoren auf den endgültigen Wasserstoffacceptor Sauerstoff.

### Bs als Metabolit.

Nach dieser Theorie bildet Bs ein Glied einer Reihe von Reaktionen des intermediären Stoffwechsels. Die Erforschung der Bs und ihrer Aufgabe im Stoffwechsel lässt sich nach zwei Hauptlinien verfolgen: Wie wird Bs eliminiert und wie wird Bs gebildet?

*Eliminierung von Bs:* Ein Zusatz von Bs zu zerschnittener Muskulatur bewirkt eine starke Zunahme des Sauerstoffverbrauchs (THUNBERG 1909). Die Muskulatur verbrennt dabei Bs zu Fumarsäure. Ein Teil der gebildeten Fumarsäure wird enzymatisch durch Wasseraddition in Apfelsäure umgewandelt (BATELLI u. STERN 1911, EINBECK 1914, 1919). THUNBERG (1917) konnte später zeigen, dass gewaschene Muskulatur anaerob nach Zusatz von Bs schnell Methylenblau entfärbt.

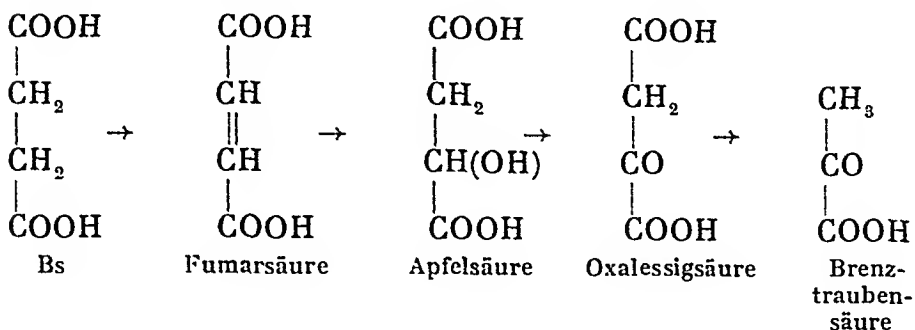
Die Entfärbung beruht darauf, dass das Methylenblau pro Molekül zwei Wasserstoffatome aufnimmt und so zu dem farblosen Leukomethylenblau reduziert wird. Das Methylenblau wirkt bei dieser Reaktion als „Wasserstoffacceptor“ und die Bs als „Wasserstoffdonator“.

Bei der Ausdeutung seiner Befunde ging Thunberg von der damals gerade aufgestellten Theorie Wielands aus, dass gewisse Oxydationen keine Zuführung von Sauerstoff, sondern vielmehr eine Entfernung von Wasserstoff, sog. Dehydrierung, darstellen. Thunberg hält es für wahrscheinlich, dass das aktive Prinzip der Bs-Dehydrierung in der Muskulatur ein Enzym ist und schlägt die Bezeichnung *Succinodehydrogenase* vor. Sämtliche Körpergewebe, vielleicht mit Ausnahme der Linse (AHLGREN 1923 b, 1927 a), enthalten Succinodehydrogenase.

Bs wird bei anaeroben Methylenblau-Versuchen ebenso umgesetzt wie aerob (siehe oben) (FISCHER 1927, HAHN u. HAARMAAN 1928). HAHN und seine Mitarbeiter haben die Umsetzung der bei der Bs-Dehydrierung gebildeten Fumarsäure und Apfelsäure untersucht. Im Verlauf dieser Forschungen ergab sich (zum Teil im Zusammenhang mit früheren Arbeiten anderer Forscher), dass Apfelsäure enzymatisch zu Oxalessigsäure dehydriert wird. Die letztere wird spontan zu Brenztraubensäure dekarboxyliert (Übersicht und Zusammenfassung dieser Ver-

suche bei HAHN 1932). Die Frage der weiteren Umsetzung der Brenztraubensäure ist noch nicht endgültig gelöst.

Für die Elimination der Bs *in vitro* lässt sich also folgendes Schema aufstellen:



Alle obenerwähnten Versuche sind *in vitro* gemacht worden, mit Schnitten, Brei oder Extrakt verschiedener Gewebe und von verschiedenen Tierarten (von Fischen und Amphibien bis zu Säugern, auch vom Menschen).

*In vivo* wird per os oder parenteral einverleibte Bs praktisch vollständig eliminiert (LONGO 1877, MARFORI 1896, BAER und BLUM 1907, FLASCHENTRÄGER 1926, BALASSA 1937, BERNHARD u. ANDREAE 1937, VERKADE et al. 1937, KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938, KRUSIUS 1940). Welche Stoffe bei der Umsetzung von Bs *in vivo* gebildet werden, ist nicht bekannt. Man vermutet, dass der *in vitro* nachgewiesene Reaktionsverlauf vor sich geht.

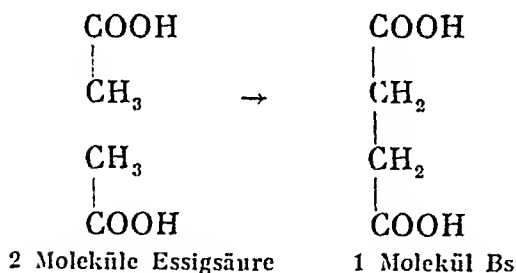
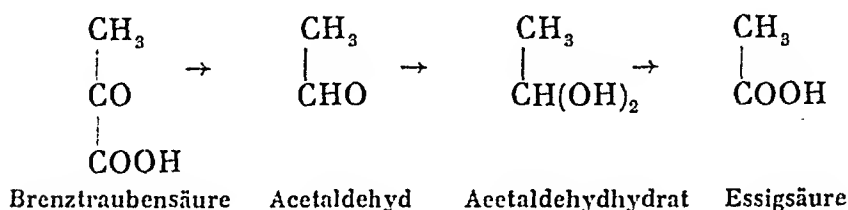
Bs kann *in vivo* Kohlehydrat bilden. Dies ist teils dadurch gezeigt worden, dass man phlorizindiabetischen Hunden Bs einverleibte, wodurch die Glykosurie zunahm (RINGER, FRANKEL u. JONAS 1913). Teils hat man nach Zuführung von Bs eine Zunahme des Glykogens der Leber festgestellt (PONSFORD u. SMEDLEY-MACLEAN 1932, MAJER u. REISNER 1933, STÖHR 1933, 1938). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Bs einen gewissen antiketogenen Effekt hat, der ebenso stark ist wie derjenige der äquivalenten Menge Glykose (MACKAY, SHERILL u. BARNES 1939)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Die Leistungsfähigkeit eines monojodessigsäurevergifteten Froschmuskels wird durch zugeführte Bs, Fumarsäure oder Glycerinphosphorsäure nicht beeinflusst. Erst nach mechanischer Schädigung des Muskels tritt bei einem Zusatz einer dieser drei Säuren eine Steigerung ein (GRIMLUND 1936). Es fragt sich, ob man aus diesen Versuchen mit geschädigter Mus-



Über die Kohlehydratbildung aus gewissen Fettsäuren über Bs siehe S. 7.

*Bs-Synthese:* Hinsichtlich der Rolle der Bs im intermediären Stoffwechsel legte THUNBERG (1920) einige Hypothesen vor, die später weiter entwickelt wurden (AHLGREN 1923 a, 1927 b). Nach diesen Forschern ist Bs ein Glied eines Kreisvorgangs. Brenztraubensäure, die bei der Bs-Umsetzung gebildet worden ist (siehe das obige Schema), wird zu Acetaldehyd dekarboxyliert. Das Acetaldehydhydrat wird zu Essigsäure dehydriert. Durch Dehydrierung von 2 Molekülen Essigsäure wird ein Molekül Bs gebildet.



Die letztgenannte Reaktion war das einzige hypothetische Glied dieser Theorie. Die beiden vorhergehenden Reaktionen können unter gewissen Versuchsbedingungen stattfinden.

Bs-Bildung durch Dehydrierung von zwei Molekülen Essigsäure ist später bei gewissen Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen) festgestellt worden. Einschlägige Literatur siehe bei OPPENHEIMER (1939). Man hat diese Reaktion bei Vertebraten noch nicht nachweisen können. (Siehe jedoch CEDRANGOLA 1937, ELLIOTT u. GREIG 1937, WEIL-MALHERBE 1937. Möglicherweise ist aus den Versuchen dieser Forscher eine gewisse Wahrscheinlichkeit dessen, dass Bs-Bildung aus Essigsäure stattfindet, zu entnehmen.)

kulatur Schlussfolgerungen über den normalen Stoffwechsel des Muskels ziehen kann. HARRISON (1939) hat untersucht, ob Frosemuskel bei Arbeit u. a. Bs und Fumarsäure verbraucht. Der (unbeschädigte) Muskel kann Fumarsäure schnell umsetzen, nicht aber Bs.

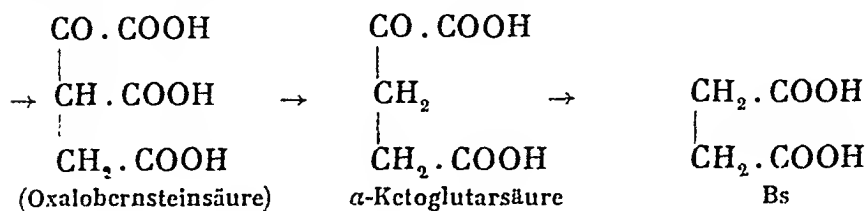
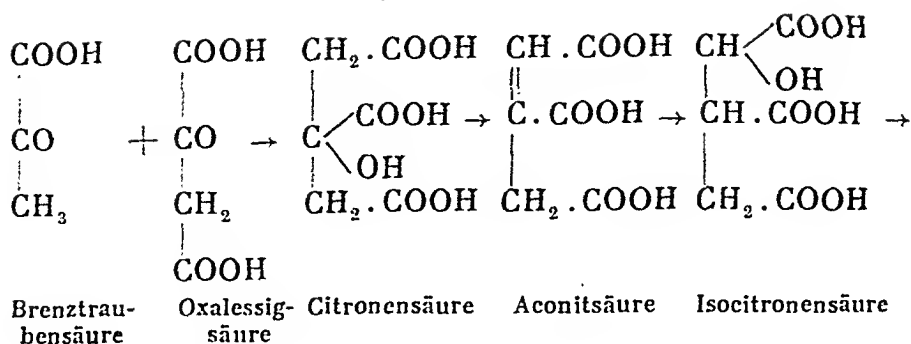
Seit Aufstellung dieser Theorie von Thunberg und Ahlgren war man ziemlich auf den Gedanken eingeschworen, dass Bs ein Glied in einem Kreisvorgang sei. Dass unter gewissen Versuchsbedingungen Bs-Bildung aus Brenztraubensäure erfolgt, kann jedoch als erwiesen angesprochen werden (TOENNISSEN u. BRINKMANN 1930, ELLIOTT u. GREIG 1937, WEIL-MALHERBE 1937 u. a.).

Von dieser Tatsache ausgehend, hat man auch andere Hypothesen und Theorien aufgestellt. Nach TOENNISSEN u. BRINKMANN (1930) werden unter Dehydrierung 2 Moleküle Brenztraubensäure zu einem Molekül  $\alpha_1$ -Diketoadipinsäure kondensiert, das dann zu Bs umgesetzt wird.

$\alpha$ -Ketoglutarsäure wird durch Kondensierung und Dekarboxylierung von 2 Molekülen Brenztraubensäure gebildet (WEIL-MALHERBE 1936) oder durch Kondensierung und Dehydrierung eines Moleküls Brenztraubensäure und eines Moleküls Essigsäure (KREBS 1936). Die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure wird dann zu Bs umgesetzt.

KREBS hat die Theorie eines „Citronensäurezyklus“ aufgestellt (KREBS u. JONHSON 1937) und sie durch mehrere Tatsachen erhärten können. Nach dieser Theorie wird aus einem Molekül Oxalessigsäure und einem Molekül Brenztraubensäure ein Molekül Citronensäure gebildet. Das Gewebe setzt dann die gebildete Citronensäure über Aconitsäure, Isocitronensäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure zu Bs um. Die weitere Umsetzung der Bs zu Oxalessigsäure oder Brenztraubensäure erfolgt nach dem Schema S. 3. (Literatur bei KREBS u. EGGLESTON 1940, KREBS 1940 b, SMYTH 1940, HALLMAN 1940, MÄRTENSSON 1940, KRUSIUS 1940). Es kann als festgestellt gelten, dass eine solche Citronensäuresynthese in vitro stattfinden und dass Citronensäure unter gewissen Versuchsbedingungen in vitro Bs bilden kann.

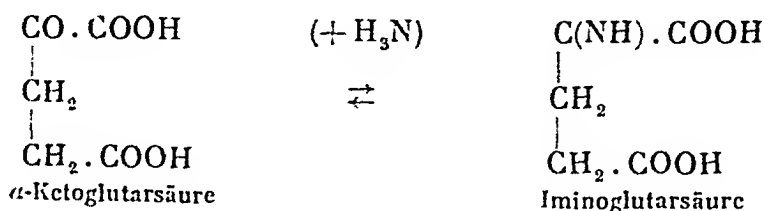
Die Metaboliten dieses Citronensäurezyklus werden nicht verbraucht, sondern bilden sich ständig neu, mit Ausnahme der Brenztraubensäure, von der bei jedem Kreislauf dieses Zyklus ein Molekül verbrannt wird. Die übrigen Säuren dieses Citronensäurezyklus dienen dabei somit als Katalysatoren. Das Substrat dieser Katalyse, Brenztraubensäure, wird nach KREBS beim Kohlehydratabbau gebildet.

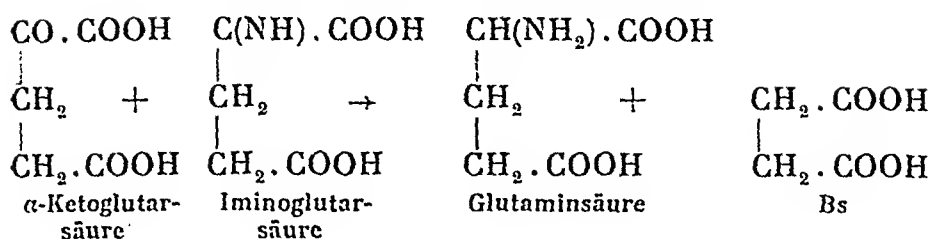


Gewisse Versuche mit Muskulatur *in vitro* lassen darauf schließen, dass die Wirkung des Insulins möglicherweise mit der Umsetzung der Citronensäure und der C<sub>4</sub>-Säuren zu tun hat (KREBS u. EGGLESTON 1938). Diese Versuche sind später einwandfrei bestätigt worden (SHORR u. BARKER 1939, STARE u. BAUMANN 1940 b). Die Forschung hat sich gerade erst dieser Frage zugewandt. Es lässt sich daher einstweilen nicht beurteilen, welche praktischen und theoretischen Konsequenzen diese Versuche haben können.

Bs kann auch auf anderen Wegen gebildet werden, so durch *Dismutierung* von 2 Molekülen  $\alpha$ -Ketoglutar säure (WEIL-MALHERBE 1937), oder durch eine solche Reaktion zwischen einem Molekül  $\alpha$ -Ketoglutar säure und einem Molekül einer anderen Ketosäure, z. B. Acetessigsäure (KREBS u. JOHNSON 1937). Krebs ist der Meinung, dass die Ketosäuren in der Regel nach diesem Prinzip umgesetzt werden.

Ähnlich kann  $\alpha$ -Ketoglutar säure mit aus dieser Säure gebildeter Iminoglutar säure reagieren. Dabei wird die erstere zu Bs und Kohlensäure oxydiert, während die letztere zu Glutaminsäure reduziert wird (KREBS u. COHEN 1939).

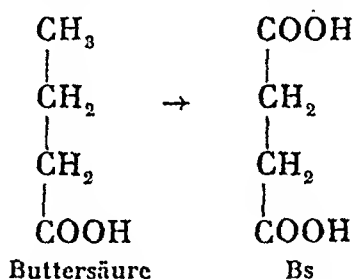




Zerkleinerte Muskulatur bildet Bs nach Zusatz von Aspariginsäure und Glutaminsäure (MOYLE 1924). Perfundierte Leber bildet Bs nach Zusatz von Arginin (FELIX, zitiert nach LEHNARTZ 1937).

Leberextrakte können nach Zusatz von  $\beta$ -Oxibuttersäure Bs bilden (KÜHNAU 1928).

Nach einer Hypothese von BLIXENKRONE-MÖLLER (1938) soll die Bildung von Kohlehydraten aus gewissen Fettsäuren über Buttersäure, Bs und Brenztraubensäure erfolgen. Die Leber soll dabei Bs aus Buttersäure bilden können.



Schliesslich sei erwähnt, dass zerkleinerte Muskulatur *anaerob spontan Bs bildet*. Die so gebildete Bs lässt sich dann unter aeroben Versuchsbedingungen eliminieren (MOYLE 1924, NEEDHAM 1927).

*Kritik: Bs-Synthese aus Essigsäure nach Thunberg—Ahlgren* hat für Vertebraten bisher nicht festgestellt werden können. Zudem sind sämtliche Versuche, die zugunsten dieser Theorie sprechen könnten, *in vitro* ausgeführt. *Bs-Bildung aus Brenztraubensäure* ist *in vitro* festgestellt worden, nicht aber *in vivo* (nur in technisch unvollkommenen Organperforationsversuchen mit ziemlich langdauernder Unterbrechung des Kreislaufs zwischen dem Tode des Tieres und dem Beginn der Perfusion, TOENNISSEN u. BRINKMANN 1930).

*Krebs' Citronensäurezyklus* ist von seiten Szent-Györgyis und seiner Schüler (BREUSCH 1937 und 1939, THOMAS 1939) heftiger Kritik ausgesetzt worden. Nach diesen Forschern erfolgen

Synthese und Abbau der Citronensäure nicht mit genügender Geschwindigkeit. Diese Kritik ist als völlig widerlegt anzusehen (KREBS u. EGGLESTON 1940, KREBS 1940 a). BREUSCH (1939) will zudem geltend machen, diese Citronensäuresynthese erfolge nur in Nierengewebe. Andere Forscher (Literatur siehe bei KREBS u. EGGLESTON 1940, SMYTH 1940, HALLMAN 1940) hingegen haben diese Citronensäurebildung in mehreren anderen Geweben festgestellt, u. a. in Herz- und Skelettmuskulatur, Leber, Hoden.

STARE u. BAUMANN (1940 a) haben vor kurzem Krebs' Theorie des Citronensäurezyklus stark kritisiert. Diese Kritik wird zum grössten Teil durch die später von Krebs und seinen Mitarbeitern veröffentlichten Versuche entkräftet (KREBS u. EGGLESTON 1940, KREBS 1940 b, SMYTH 1940).

Alle hier referierten Versuche über den Citronensäurezyklus sind *in vitro* an Schnitten, Brei oder Extrakten verschiedener Gewebe ausgeführt worden. Versuche, den Citronensäurezyklus einwandfrei unter durchaus physiologischen Bedingungen nachzuweisen (in vivo, am ganzen Tier oder bei Organperfusion), sind misslungen. Die Metaboliten des Citronensäurezyklus rufen zwar am ganzen Tier eine gesteigerte Citronensäureausscheidung mit dem Harn und eine erhöhte Citronensäurekonzentration im Blut hervor (ORTEN u. SMITH 1937, KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938). Indessen sind diese Ergebnisse, wenigstens was die Apfelsäure anlangt, kein Beweis des Citronensäurezyklus, wie durch nähere Analyse der Versuchsbedingungen festgestellt worden ist (MÅRTENSSON 1940).

Tatsachen, welche direkt bestätigten, dass  $\alpha\alpha_1$ -Diketo adipinsäure (TOENNISSEN u. BRINKMANN 1930) oder Buttersäure (BLIXENKRONE-MÖLLER 1938) die physiologische Muttersubstanz der Bs wäre, sind bisher nicht vorgelegt worden.

Alle referierten Versuche sind *in vitro* ausgeführt. Mit einer Ausnahme (MOYLE 1924, NEEDHAM 1927, siehe S. 7) waren es „Belastungsversuche“, d. h. ein Stoff wird dem Enzympräparat zugesetzt, wobei man die Umsetzung dieses Stoffes oder die dabei gebildeten Stoffe studiert. Die Schlussfolgerungen hinsichtlich physiologischer Verhältnisse, die sich aus solchen Experimenten ziehen lassen, sind selbstverständlich begrenzt. Man kann daraus keine direkten Schlüsse in bezug auf den Stoffwechsel intakter Gewebe (in vivo) ziehen. Dies wird allzuoft vergessen, trotzdem mehrere Autoren es betonen (THUNBERG 1920, SZENT-GYÖRGYI 1937, WIELAND et al. 1939). Wieland

schreibt in einer Arbeit über die Umsetzung von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure folgendes (WIELAND et al. 1939, S. 155): „Man muss beachten, dass die Veränderungen, die im abgetrennten und zerkleinerten Organ studiert werden können, höchstens darüber Auskunft geben, was die noch wirksamen Enzyme leisten können, nicht aber was das intakte Organ im normalen Stoffwechsel wirklich leistet“.

Hinsichtlich der *Umsetzung von Bs in vivo* ist nur gezeigt worden, dass zugeführte Bs schnell und praktisch vollständig eliminiert wird.

*In vitro* wird Bs zu Brenztraubensäure abgebaut und kann von hier aus resynthetisiert werden, entweder über Citronensäure oder auf direkterem Wege über  $\alpha$ -Ketoglutar Säure. Bildung von Bs *in vitro* aus anderen Stoffen ist nachgewiesen (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin) bzw. aus bestimmten Gründen angenommen worden ( $\alpha\alpha_1$ -Diketoadipinsäure, Buttersäure, Essigsäure).

*In vivo* zugeführte Bs wird schnell eliminiert, hierbei kann Kohlehydrat gebildet werden.

Letzteres, nebst der Tatsache, dass Bs normal in verschiedenen Geweben vorkommt, macht es *wahrscheinlich*, dass die Bs irgendwie am normalen intermediären Stoffwechsel beteiligt ist.

### Bs als Katalysator.

Nach Szent-Györgyi dient die Bs als Katalysator beim Wasserstofftransport der Gewebsoxydation (GÖZSY u. SZENT-GYÖRGYI 1934). Mit der Zeit hat Szent-Györgyi gewisse Teile seines theoretischen Systems modifiziert. Die folgende Darstellung stützt sich auf die in Szent-Györgyis letzten Schriften vorgelegte Gestalt der Theorie<sup>1</sup>.

Der physiologisch wichtigste Wasserstoffdonator ist nach Szent-Györgyi Triosephosphat, das vom Gewebe zu Brenztraubensäure oxydiert wird. Der Wasserstoffacceptor für den bei dieser Dehydrierung freiwerdenden Wasserstoff ist im Gewebe die *Oxalessigsäure*, die hierbei mit Hilfe von Maliccodehydrogenase zu Apfelsäure reduziert wird. Diese Säure steht durch Fumarase stets im Gleichgewicht mit einer gewissen Menge

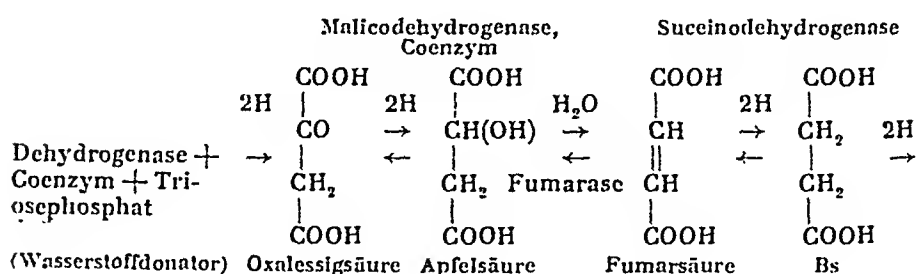
<sup>1</sup> Eine vollständige Darstellung der Theorie findet sich in SZENT-GYÖRGYI, (1937 b); kürzere Übersicht SZENT-GYÖRGYI (1939). Siehe auch OPPENHEIMER (1939) und NORD u. WEIDENHAGEN (1940).

Fumarsäure. Darauf wird die gebildete *Apfelsäure* dehydriert und Oxalessigsäure wiedergebildet. Als Wasserstoffacceptor fungiert (über das Protoflav) *Fumarsäure*, die mit Hilfe der Succinodehydrogenase zu Bs reduziert wird. Es wird also mit anderen Worten Apfelsäure-Fumarsäure zu Oxalessigsäure und Bs „dismutiert“. Die gebildete *Bernsteinsäure* wird dehydriert, es bildet sich erneut Fumarsäure und der dabei freiwerdende Wasserstoff wird auf das Cytochrom C übertragen. Auf dem Wege über Cytochrom und Cytochromoxydase gelangt der Wasserstoff an den endgültigen Wasserstoffacceptor, den Sauerstoff.

Die obengenannten vier Säuren — alle enthalten 4 Kohlenatome, weshalb Szent-Györgyi sie die  $C_4$ -Säuren nennt, — dienen also als Katalysatoren beim Wasserstofftransport. Der „Strom“ von Wasserstoff, der bei der Gewebsoxydation von den Wasserstoffdonatoren zum Sauerstoff geht, passiert nach Szent-Györgyi zum allergrössten Teil das  $C_4$ -Säurensystem. Die  $C_4$ -Säuren schwingen dabei zwischen reduzierten und oxydierten Formen.

Die Succinodehydrogenase und Malicodehydrogenase sind nach Szent-Györgyi keine Dehydrogenasen, sondern H-Transportasen, wobei Fumarsäure und Apfelsäure-Oxalessigsäure eher die prosthetischen Gruppen dieser Enzyme als ihre Substrate sind.

Szent-Györgyis Theorie kann durch folgendes Schema veranschaulicht werden:



Szent-Györgyis Theorie hat einige Kritik hervorgerufen, ist aber überraschenderweise ziemlich allgemein angenommen worden (siehe z. B. STERN 1940, FRANKE 1940, KREBS u. EGGLESTON 1940, KUTSCHER u. SARREITER 1940). Ich werde zunächst die wichtigsten Tatsachen anführen, worauf Szent-Györgyi seine Theorie stützt, dann ganz kurz auf die Kritik eingehen und auch einige eigene kritische Gesichtspunkte vortragen.

*Tatsachen zur Stütze der  $C_4$ -Säurenkatalyse* (hauptsächlich

aus den Untersuchungen Szent-Györgyis und seiner Mitarbeiter):

1. *Katalysenwirkung der C<sub>4</sub>-Säuren*: Ein Zusatz einer C<sub>4</sub>-Säure (Bs, Fumarsäure, Apfelsäure) steigert den Sauerstoffverbrauch von Muskulatur *in vitro*. Diese Steigerung ist grösser, als es die vollständige Verbrennung der zugesetzten Säuremenge bedingt. Zugesetzte Fumarsäure und Apfelsäure werden nicht verbraucht, sondern lassen sich innerhalb der Fehlergrenzen der Methode nach Beendigung des Versuchs quantitativ wiederfinden. (Eine entsprechende Untersuchung ist für Bs nicht ausgeführt worden). Literatur: GÖZSY u. SZENT-GYÖRGYI (1934), STRAUB (1935) S. 47—49, ANNAU u. STRAUB (1937). Analysenmethode für Fumarsäure: STRAUB (1935), SZEGEDY (1937 a u. b). Analysenmethode für Apfelsäure: STRAUB (1936), S. 117.

2. *Malonathemmung des Sauerstoffverbrauchs*: Die Atmung der Muskulatur *in vitro* wird in gleichem Grade durch Cyanid und Malonat gehemmt. (Die Malonsäure hemmt spezifisch die Succinodehydrogenase.) Nach Szent-Györgyi zeigt dies die Bedeutung der C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse für die Atmung und die Bedeutung intakter Succinodehydrogenase hierfür. Literatur: SZENT-GYÖRGYI (1937 b) S. 21, GÖZSY u. SZENT-GYÖRGYI (1934), STARE u. BAUMANN (1936) S. 343.

3. *Aufhebung der Malonathemmung*: Der Sauerstoffverbrauch von Muskulatur *in vitro* bei Malonathemmung wird auf die normale Höhe gebracht, wenn man C<sub>4</sub>-Säuren (Fumarsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure) zusetzt. Mehrere andere organische Säuren, die gleichzeitig untersucht wurden, hatten nicht diesen Effekt. (Brenztraubensäure ist nicht untersucht worden.) Bemerkenswerterweise bleibt ein Zusatz von Bs ohne Einfluss auf die Atmung bei Malonathemmung. Literatur: GÖZSY u. SZENT-GYÖRGYI (1934), BANGA (1935).

4. *Die Einzelreaktionen bei Malonathemmung*: Bei Malonathemmung von Muskulatur *in vitro* verschwindet zugesetzte Fumarsäure unter *aeroben* Versuchsbedingungen. Gleichzeitig wird etwa die äquivalente Menge Bs gebildet. Der Sauerstoffverbrauch nimmt ab, nachdem die zugesetzte Fumarsäure verbraucht ist. *Anaerob*, bei im übrigen gleichen Versuchsbedingungen, verschwindet indessen die zugesetzte Fumarsäure bei Malonathemmung nicht (STRAUB 1935, S. 48, GREVILLE 1937). — Szent-Györgyi erklärt dies damit, dass die Malonsäure die Bs-Dehydrierung weit stärker hemmt als die Fumarsäure-Hydrierung. Um die Fumarsäure-Hydrierung zu 50 % zu hemmen, ist eine



5mal stärkere Malonatkonzentration als für die entsprechende Hemmung der Bs-Dehydrierung erforderlich (DAS 1937). Szent-Györgyi zieht daraus folgenden Schluss: Bei Malonathemmung wird die zugesetzte Fumarsäure mit Wasserstoff von den Wasserstoffdonatoren hydriert. Wegen der starken Malonathemmung der Bs-Dehydrierung kann die dabei gebildete Bs nicht (oder nur zu einem geringen Teil) dehydriert werden und deshalb keine Neubildung von Fumarsäure erfolgen. Der Sauerstoffverbrauch hört somit auf, wenn die zugesetzte Fumarsäure verbraucht und als Bs fixiert ist. Literatur: SZENT-GYÖRGYI (1937 b) S. 22.

5. *Oxydation von Fumarsäure und Reduktion von Oxalessigsäure*: Zugesetzte Fumarsäure wird von Muskulatur *in vitro* zu Oxalessigsäure oxydiert, letztere kann mit Hydrazin fixiert werden. Auch Glutaminsäure reagiert schnell mit Oxalessigsäure und kann als Abfangmittel dienen. — Praktisch alle *in vitro* zugesetzte Oxalessigsäure wird nach kurzer Zeit als Apfelsäure und Fumarsäure wiedergefunden. Literatur: BANGA (1936), S. 130, BANGA u. SZENT-GYÖRGYI (1937).

Fumarsäure und Apfelsäure wurden nach STRAUB (1935) analysiert.

6. *Die Kohlehydratverbrennung wird durch die C<sub>4</sub>-Säuren katalysiert*: Die respiratorische Quote bei Malonathemmung *in vitro* steigt nach Zusatz von Fumarsäure gegen 1 an. Nach Szent-Györgyi deutet dies an, dass die Kohlehydratverbrennung (bei der die  $RQ = 1$ ) von den C<sub>4</sub>-Säuren katalysiert wird. Literatur: BANGA (1936), s. 136, SZENT-GYÖRGYI (1936) S. 110.

7. *Der Wasserstoffdonator bei der C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse*: Nach Szent-Györgyi ist bei Versuchen *in vitro* Triosephosphat normal der wichtigste Wasserstoffdonator für die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse. Das Triosephosphat wird dabei zu Brenztraubensäure oxydiert. Literatur: LAKI (1936) S. 142, SZENT-GYÖRGYI (1936) S. 112—113, BANGA (1937 a).

8. *C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse in verschiedenen Geweben*: Die oben referierten Versuche sind grösstenteils mit zerkleinerter Brustmuskulatur der Taube oder mit Extrakt desselben Materials ausgeführt. Ferner hat man andere Gewebe, auch von anderen Tieren, *in vitro* untersucht. Dabei wurden bei im ganzen gleichbleibender Methodik in der Hauptsache folgende Befunde erhoben: a) Der Sauerstoffverbrauch steigt nach Zusatz von Fumarsäure, die dabei nicht eliminiert wird. b) Malonsäure hemmt den Sauerstoffverbrauch im selben Grade wie Cyanid.

c) Die Malonathemmung des Sauerstoffverbrauchs wird durch Zusatz von Fumarsäure aufgehoben. d) Bs, Apfelsäure und Oxallessigsäure haben dieselbe Wirkung wie Fumarsäure (mit Ausnahme dessen, dass Bs die Malonathemmung nicht aufheben kann). Literatur: ANNAU (1935) S. 58, BOYLAND u. BOYLAND (1936), GREVILLE (1936), STARE (1936), STARE u. BAUMANN (1936), BANGA, OCHOA u. PETERS (1939).

9. *Versuche in vivo*: Die oben referierten Versuche sind sämtlich *in vitro* mit Extrakt, Brei oder Schnitten verschiedener Gewebe ausgeführt. Der Stoffwechsel dünner Gewebsschnitte dürfte mehr mit den physiologischen Verhältnissen übereinstimmen, als der in Brei und Extrakt. Aber auch bei Gewebsschnitten hat eine Schädigung des Gewebes stattgefunden. Es ist deshalb auch hier ungewiss, ob der Versuch den Stoffwechsel intakten Gewebes wiedergibt (siehe auch S. 9). Es sind nur wenige *in vivo*-Versuche gemacht worden, mit Injektion von Malonat, Fumarat oder Arsenit an der Ratte oder am Kaninchen und nachher qualitativer Analyse von Aceton und Brenztraubensäure im Harn. Intravenös eingespritztes Malonat bewirkt im Harn eine starke Acetonreaktion, die indessen bei gleichzeitiger Injektion von Malonat und Fumarat ausbleibt. In Anlehnung an diese Versuche *in vivo* und ähnliche *in vitro* nahm Szent-Györgyi an, dass die Bildung von Acetonkörperchen bei Diabetikern auf mangelnder  $C_4$ -Säurenkatalyse beruhe. Gab man Zuckerkranken per os Bs ein, so verschwand die Ausscheidung von Acetonkörpern mit dem Harn ganz oder zum Teil (KORÁNYI u. SZENT-GYÖRGYI 1937). Diese Ergebnisse haben andere Forscher indessen nicht wiederholen können. Literatur siehe MÜLLER, FRIEDRICH u. BUCHWALD 1938).

Bei Einverleibung von Bs per os beim Menschen findet man im Harn keine Bs und nur Spuren von Fumarsäure und Apfelsäure (BALASSA 1937).

Dies sind die einzigen Versuche, die  $C_4$ -Säurenkatalyse unter physiologischen Verhältnissen, *in vivo*, nachzuweisen, die bisher von Szent-Györgyi und seinen Mitarbeitern gemacht worden sind.

*Kritik von Szent-Györgyis Theorie über die  $C_4$ -Säurenkatalyse*: Was *Szent-Györgyis Versuchsmethodik* angeht, lege ich nur einige kritische Gesichtspunkte hinsichtlich der Methoden zur Bestimmung von Bs, Fumarsäure und Apfelsäure vor.

Die Methode zur *Bestimmung von Bs* (GÖZSY 1935) umfasst Fällung von Eiweiss, Oxydation des Filtrats mit Kaliumpermanganat zur Entfernung störender Substanzen und Ätherextrak-

tion. Gewaschene Taubenbrustmuskulatur wird mit der so vorbehandelten Analysenprobe versetzt. Die dabei verbrauchte Sauerstoffmenge wird mit dem Sauerstoffverbrauch nach Zusatz einer bekannten Menge Bs unter sonst identischen Versuchsbedingungen verglichen. Hierdurch wird die in der Probe vorhandene Bs-Menge berechnet. — Die Oxydation mit Permanganat bewirkt indessen, dass einige Stoffe zu Bs oxydiert werden. So wird  $\alpha$ -Ketoglutar säure unter diesen Versuchsbedingungen quantitativ zu Bs umgewandelt, so dass also *mit dieser Methode Bs +  $\alpha$ -Ketoglutar säure bestimmt werden*. Unter gewissen Umständen kann dies eine wichtige Fehlerquelle ausmachen (KREBS 1940 b, S. 777—778).

Bei der *Bestimmung der Fumarsäure* hat man mit zwei Methoden gearbeitet. Die zuerst ausgearbeitete (STRAUB 1935) umfasst Eiweissfällung, Ätherextraktion, Beseitigung des Äthers und Lösung des restlichen Extraktes in Wasser. Die wässrige Lösung wird mit Permanganat titriert. Durch Vergleich mit dem Permanganatverbrauch reiner Fumaratlösungen wird die Fumarsäurekonzentration in der Analysenprobe berechnet. Mit dieser Methode bestimmt man also ausser Fumarsäure alle aus saurer Lösung ätherextrahierbaren Stoffe, die Permanganat verbrauchen, d. h. *alle ätherlöslichen, ungesättigten Säuren*. Auch Malonsäure wird durch Permanganat oxydiert. Die Spezifität der Methode ist also schlecht. — Szent-Györgyi liess später in seinem Institut eine neue Methode zur Bestimmung von Fumarsäure ausarbeiten (SZEGEDY 1937 a). Diese Methode umfasst Eiweissfällung und Ätherextraktion wie oben. Aus der wässrigen Lösung der ätherextrahierten Stoffe wird Fumarsäure als Mercuriofumarat ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, gewaschen, und das Mercuriofumarat wird in Natriumfumarat übergeführt. Eine bekannte Menge Brom (als Bromwasser) wird zugesetzt, wobei die Fumarsäure quantitativ zu Dibrombernsteinsäure bromiert wird. Der Bromverbrauch gibt die vorhandene Fumarsäure-Menge an. Der prinzipielle Unterschied zwischen dieser und der ersteren Methode ist nur der, dass zwischen die Ätherextraktion und die Titration auf die Menge ungesättigter Substanz das Fällen der Fumarsäure als Mercuriosalz eingeschoben ist. Diese Methode gestattet eine etwas höhere Spezifität als die vorige, da hier *alle ätherlöslichen, ungesättigten Säuren, die schwerlösliche Mercuriosalze geben*, bestimmt werden. SZEGEDY (1937 b) hat mit dieser Methode nur Fumarsäurebestimmungen in Gegenwart von Bs, Apfelsäure. Brenz-

traubensäure und Malonsäure ausgeführt. Zum Beispiel Mercurooxalat ist schwerlöslich. Man kann auch mit dieser Methode Oxalsäure quantitativ bestimmen. In Versuchen aus Szent-Györgyis Institut (BALASSA 1937) ist diese Methode zur Fumarsäurebestimmung an Menschenharn angewandt worden. Die dabei erhaltenen „Fumarsäurewerte“ stimmen gut mit der normalen Oxalsäurekonzentration des Harns überein. — Auch die Spezifität dieser Methode ist also unbefriedigend.

Die Eiweissfällung bei Bestimmung von Fumarsäure nach diesen Methoden bedeutet noch eine Fehlerquelle. Wird das Eiweiss in der Analysenprobe mit Alkohol ausgefällt, so wird keine Fumarsäure an den Eiweissniederschlag adsorbiert. Dabei aber werden inkonstant kleine Mengen von irgendeiner Substanz extrahiert, die Permanganat verbraucht. Deshalb ist Alkohol als Eiweissfällungsmittel ungeeignet (STRAUB 1935, S. 44). Statt dessen hat man in der Regel Trichloressigsäure verwendet. Dabei werden hingegen 25—40 % zugesetzter Fumarsäure an den Eiweissniederschlag adsorbiert. Der Verf. hat diesen Adsorptionsverlust als Funktion der Fumaratkonzentration graphisch darstellen lassen und korrigiert seine Analysenergebnisse nach diesem Diagramm (STRAUB 1935, S. 45). Es ist unwahrscheinlich, dass diese Adsorption unter wechselnden Versuchsbedingungen mit Änderungen der Ionenkonzentration, des Dispersionsgrades der Eiweissfällung usw. konstant bleibt. Die quantitativen Berechnungen, die sich auf Analysenergebnisse mit dieser Korrektur von 25—40 % gründen, dürften sehr unsicher sein.

Die Bestimmung von Apfelsäure erfolgt durch Feststellung der gesteigerten Drehung polarisierten Lichtes, die bei Zusatz von Uranylacetat eintritt (STRAUB 1936, S. 123). Aus dem gefundenen Wert wird durch Vergleich mit der entsprechenden Steigerung bei reinen l-Malatlösungen die Menge der l-Apfelsäure in der Analysenprobe berechnet. Milchsäure ist nach Straub der einzige Stoff von praktischer Bedeutung, der die Bestimmung stören kann. Die Wirkung von Uranylacetat auf Laktatlösungen ist jedoch nur  $\frac{1}{10}$  so stark wie der entsprechende Effekt auf dieselbe Konzentration von l-Malat. Eine solche Wirkung von Uranylsalzen ist indessen unter optisch aktiven organischen Säuren nicht so selten. Die Drehung polarisierten Lichtes der Lösungen von Isocitronensäure und l- $\alpha$ -Oxyglutarsäure wird nach Zusatz von Uranylacetat in etwa demselben Grade gesteigert, wie für Malatlösungen. Es ist unmöglich zu

entscheiden, welche Rolle diese beiden Säuren bei der Bestimmung von Apfelsäure unter den von Szent-Györgyi zur Anwendung gebrachten Versuchsbedingungen haben spielen können. Das Vorkommen dieser beiden Säuren unter verschiedenen Verhältnissen ist nämlich noch wenig erforscht. — Ebenso wie bei der Fumarsäurebestimmung hat man auch bei der Bestimmung von Apfelsäure eine Korrektur für die Adsorption von Apfelsäure an den Eiweissniederschlag eingeführt. Die Verluste schwanken hier zwischen 15 und 40 % (STRAUB 1936, S. 125).

*Kritik der oben angegebenen Versuche (S. 11—15), die Szent-Györgyi als Stütze seiner Theorie anzieht:*

ad 1. Nach dem, was oben über die zur Anwendung gebrachte Methodik gesagt wurde, muss man bei Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen von Fumarsäure- und Apfelsäurebestimmungen vorsichtig sein. — Nach Versuchen mit Muskulatur *in vitro* wird alle zugesetzte „Fumarsäure“ wiedergefunden. Dies kann darauf beruhen, dass eine andere ätherlösliche, ungesättigte Säure gebildet worden ist und das Analyseergebnis somit nicht auf Fumarsäure beruht. Aber das Versuchsergebnis kann auch anzeigen, dass Eliminierung und Bildung von Fumarsäure und Apfelsäure etwa mit gleicher Geschwindigkeit erfolgen. Dass zugesetzte Fumarsäure oder Apfelsäure nicht verbraucht wird, braucht also nicht auf C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse hinzudeuten.

STARE u. BAUMANN (1940 a) haben gefunden, dass neben Bs, Fumarsäure und Apfelsäure auch  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Citronensäure und Glutaminsäure einen Katalyseneffekt auf die Atmung von Muskulatur *in vitro* hervorrufen können. Die Glutaminsäure hat unter diesen sechs Säuren die stärkste Wirkung. Nach Ansicht der genannten Autoren ist die Wirkung der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Citronensäure und Glutaminsäure vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Muskulatur aus diesen Stoffen C<sub>4</sub>-Säuren bildet, die dann diesen Katalyseneffekt hervorrufen. Für die Citronensäure ist schon früher auf diese Möglichkeit hingewiesen worden (BREUSCH 1937, ELLIOTT u. ELLIOTT 1939). Nach Stare und Baumann bewirkt aber Glutaminsäure eine stärkere Zunahme der Atmung, als die entsprechende Konzentration der C<sub>4</sub>-Säuren, die nach dieser Theorie die eigentliche Ursache des Effektes der Glutaminsäure auf die Atmung sein sollen.

ad 2. WEIL-MALHERBE (1937) hebt hervor, dass Malonat nicht spezifisch hemmend auf Succinodehydrogenase ein-

wirke. Diese Hemmung ist indessen *relativ* spezifisch, grosse Mengen Malonsäure hemmen auch andere Dehydrogenasen (DAS 1937). Es kann indessen als erwiesen gelten, dass von den bisher untersuchten Enzymen die Succinodehydrogenase für Malonathemmung am empfindlichsten ist. Damit wird Weil-Malherbes Kritik erheblich entkräftet. — In Hirn- und Nervengewebe *in vitro* wird (im Gegensatz zu Muskulatur) der Sauerstoffverbrauch durch Cyanid weit stärker gehemmt als durch Malonat (HUSZÁK 1940 a). Nach HUSZÁK lässt dies erkennen, dass der grössere Teil des Wasserstofftransports nicht über das  $C_4$ -System erfolgt.

ad 3. Die Malonathemmung des Sauerstoffverbrauchs wird unter den von Szent-Györgyi untersuchten Stoffen nur von Fumarsäure, Apfelsäure und Oxalessigsäure aufgehoben, *nicht aber von Bs*. Brenztraubensäure ist von Szent-Györgyi und seinen Mitarbeitern nicht untersucht worden. (Szent-Györgyis Erklärung für die ausbleibende Bs-Wirkung wird weiter unten, S. 18, behandelt.) *Die Malonathemmung wird bei Versuchen mit Rattendiaphragma in vitro sowohl durch Fumarsäure als durch Brenztraubensäure aufgehoben* (GREVILLE 1936). — *Die Malonathemmung wird bei Versuchen in vitro mit Hirngewebe durch Fumarsäure nicht aufgehoben* (HUSZÁK 1940 a).

STARE u. BAUMANN (1940 a) haben kürzlich untersucht, welche Stoffe die Malonathemmung der Muskelatmung *in vitro* aufheben können. Fumarsäure, Apfelsäure und, überraschenderweise,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure heben in gleicher Konzentration wie die Malonsäure diese Hemmung vollständig auf. Soll Bs diese Hemmung völlig beseitigen, so ist eine doppelt so starke Bs-Konzentration wie die Malonatkonzentration notwendig. Unter entsprechenden Versuchsbedingungen heben Citronensäure und Glutaminsäure die Malonathemmung nicht vollständig auf. Stare und Baumann legen diese Befunde zugunsten der  $C_4$ -Säurentheorie aus, während Krebs' Citronensäuretheorie kritisiert wird. Die Wirkung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure lässt sich indessen nicht in den Rahmen der  $C_4$ -Säurentheorie einfügen. (Zur Kritik des Citronensäurezyklus siehe S. 8.)

ad 4. Szent-Györgyis Erklärung für die Bs-Bildung aus Fumarsäure bei Malonathemmung unter aeroben Bedingungen geht dahin, dass die Malonsäure die Bs-Dehydrierung viel stärker hemme als die Fumarsäurehydrierung. SZENT-GYÖRGYI (1937, S. 22) stützt seine Theorie auf Versuche von DAS (1937). Diese Versuche sind indessen mit mangelhafter Technik aus-

geführt (siehe hierüber S. 68). Mit anderer und sicherer Versuchstechnik habe ich gezeigt, dass die Malonsäure in etwa demselben Grade die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäurehydrierung hemmt (Kapitel III, S. 76). Szent-Györgyis Erklärung ist somit unzutreffend. OPPENHEIMER (1939, S. 1284) weist darauf hin, dass sie auch rein theoretisch unwahrscheinlich sei.

Bei der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch die Malonsäure müsste nach der C<sub>4</sub>-Säurentheorie diese Hemmung in etwa gleichem Grade von Bs und Fumarsäure beeinflusst werden können. Bekanntlich aber *wird diese Malonathemmung durch Fumarsäure aufgehoben, hingegen nicht durch Bs*. Die Ergebnisse bei Malonathemmung lassen sich also nicht mit Hilfe der C<sub>4</sub>-Säurentheorie erklären, wie auch mehrere Forscher dargelegt haben (OPPENHEIMER 1939, KREBS u. JOHNSON 1937, KREBS u. EGGELSTON 1940, POTTER 1940).

Können die vorliegenden Versuchsergebnisse zur Erklärung dieser Erscheinungen beitragen?

*Fumarsäurehydrierung:* Diese Reaktion wird durch Malonsäure stark gehemmt (eigene Versuche, Kap. III, S. 76). Wird Muskelextrakt mit Fumarsäure versetzt, so wird *anaerob* Bs gebildet. *Diese Bs-Bildung aus Fumarsäure wird durch Malonat stark gehemmt* (GREVILLE 1937).

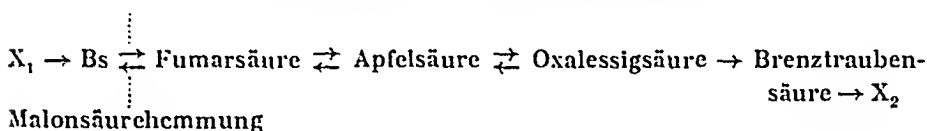
*Aerobe Bs-Bildung bei Malonathemmung:* Wird zerkleinerte Muskulatur mit Fumarsäure allein versetzt, so wird *aerob* keine Bs gebildet. Nach der C<sub>4</sub>-Säurentheorie liegt dies daran, dass die bei Hydrierung der Fumarsäure gebildete Bs schnell wieder dehydriert wird, wobei der Wasserstoff über das Cytochromsystem auf Sauerstoff übertragen wird. Die maximale Bs-Bildung des Enzympräparats müsste sich demnach *anaerob* nach Zusatz von Fumarsäure zeigen. Hier ist ja infolge des fehlenden Sauerstoffs die Umsetzung (Dehydrierung) der Bs verhindert. Aber *aerob bildet sich nach Zusatz von Fumarsäure und Malonsäure sogar mehr Bs als anaerob* nach Zusatz von Fumarsäure allein (GREVILLE 1937). — Nach dem oben Gesagten wird die Bs-Bildung aus Fumarsäure stark durch Malonsäure gehemmt. Die *aerob* gebildete Bs bei Malonat- und Fumaratzusatz (etwa 10mal grösser als unter entsprechenden Versuchsbedingungen *anaerob*) ist deshalb sehr wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil aus Fumarsäure gebildet worden. *Der grössere Teil der Bs ist also aus einem anderen Stoff als Fumarsäure entstanden.*

*Der Sauerstoffverbrauch bei Zusatz von Malonat:* Der Sauerstoffverbrauch ist bei Zusatz von Fumarsäure allein zu Muskulatur *in vitro* ebenso gross wie bei Zusatz von Malonsäure + Fumarsäure. Nach der C<sub>4</sub>-Säurentheorie beruht der Sauerstoffverbrauch darauf, dass der Wasserstoff bei der Dehydrierung der Bs (über das Cytochromsystem) auf Sauerstoff übertragen wird. Nun wird aber sowohl die Bs-Dehydrierung als die Bs-Bildung

aus Fumarsäure durch Malonsäure gehemmt. Daher kann bei Malonathemmung nur ein kleiner Teil des Sauerstoffverbrauchs auf einer Fumarsäure-Bs-Katalyse des Wasserstofftransports beruhen. Bei Zusatz von Malonsäure + Fumarsäure verschwindet die Fumarsäure. Der Sauerstoffverbrauch, der von Beginn des Versuchs an hoch war, nimmt schnell ab, wenn die Fumarsäure verbraucht ist (STRAUB 1935, KREBS u. EGGLESTON 1940). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs (bei Zusatz von Fumarsäure zu einem malonathemmteten System) darauf beruht, dass die zugesetzte Fumarsäure oxydiert wird<sup>1</sup>.

Es ist nach den referierten Ergebnissen wahrscheinlich, dass bei Malonathemmung Bs aus einem anderen Stoff als Fumarsäure gebildet und dass die zugesetzte Fumarsäure oxydativ eliminiert wird.

Wie das nachstehende Schema zeigt, lassen sich die Ergebnisse bei Malonathemmung in vitro leicht erklären, wenn die C<sub>4</sub>-Säuren statt Katalysatoren Stoffwechselprodukte sind.



In diesem Fall wird ständig Bs gebildet und umgesetzt. Die Malonsäure hemmt die Succinodehydrogenase und hindert damit die Bs-Eliminierung, weshalb sich allmählich gebildete Bs ansammelt. In den Geweben ist normal die Vorstufe der Bs in geringer Menge verfügbar, denn etwas Bs bildet sich in vitro aerob bei Zusatz von Malonat allein. Die Menge dieser Substanz wird durch Zusatz von Fumarat gesteigert, denn wie oben gesagt, steigert Fumarat stark die Bs-Bildung bei Malonathemmung.

Die Versuche geben keinen andern Bescheid über die Natur dieser Vorstufe oder über den Weg des Abbaues der Fumarsäure. Da Fumarsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure und Brenztraubensäure die Bs-Ausbeute bei Malonathemmung steigern, liegt die Annahme nahe, dass hier ein Kreisvorgang erfolgt, der von der Malonsäure bei der Bs-Dehydrierung unterbrochen wurde. Nach KREBS (Literatur siehe S. 5) vermag die Theorie eines Citronensäurezyklus die Ergebnisse bei der Malonathemmung zufriedenstellend zu erklären.

*Bei Malonathemmung von Muskulatur in vitro erfolgt ä-*

<sup>1</sup> Die gebildete Bs ist etwa der verschwundenen Fumarsäure äquivalent (GÖZSY 1935). Wie oben (S. 15) bemerkt, kann man wegen der unvollkommenen Analysenmethoden kaum quantitative Schlussfolgerungen aus den Versuchen ziehen.



*sserst wahrscheinlich eine oxydative Umsetzung zugesetzter Fumarsäure. Die unmittelbare Vorstufe der hierbei gebildeten Bs ist nicht Fumarsäure.*

ad 5. Szent-Györgyi ist der Ansicht, dass bei Versuchen *in vitro* praktisch alle zugesetzte Oxalessigsäure zu Apfelsäure reduziert werde und dass die Dekarboxylierung von Oxalessigsäure zu Brenztraubensäure normal von untergeordneter Bedeutung sei. Die letztere Reaktion diene nur dazu, bei Bedarf Überschüsse an C<sub>4</sub>-Säuren zu entfernen, falls das Gewebe bereits eine für die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse ausreichende Menge solcher Säuren enthalte (BANGA u. SZENT-GYÖRGYI 1937). Die Oxalessigsäure wird also zu Apfelsäure reduziert, die durch Fumarase mit einer gewissen Menge Fumarsäure im Gleichgewicht steht. Bei der Beurteilung dieser Versuche muss ich wiederum auf die Unsicherheit der für die Bestimmung von Fumarsäure und Apfelsäure angewandten Methoden hinweisen. — Aber auch mit der von Szent-Györgyi angewandten Methodik lässt sich feststellen, dass zugesetzte Oxalessigsäure *in vitro* auf andere Weise umgesetzt wird als durch Reduktion zu Apfelsäure. BREUSCH (1939) hat *in vitro* verschiedene Gewebe mit einer bekannten Menge Oxalessigsäure versetzt. Durch Analyse zahlreicher organischer Säuren (Citronensäure, Fumarsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure, Brenztraubensäure, Milchsäure) hat er unter Verwendung von Szent-Györgyis Methodik untersucht, ob der verschwundenen Oxalessigsäure die Summe der gebildeten anderen Säuren entspreche oder ob in dieser „Bilanzuntersuchung“ ein Mangel entstehe. Ein solches Defizit würde andeuten, dass bei der Elimination der Oxalessigsäure ein anderer Metabolit gebildet worden ist. In Niere, Pankreas, Lunge, Milz, Placenta und peripheren Nerven entspricht die Menge der verschwundenen Oxalessigsäure der Menge der gebildeten anderen Säuren, die sich grösstenteils aus Fumarsäure und Apfelsäure zusammensetzt. Bei Versuchen mit Hirngewebe findet man nur 20 % der eliminierten Oxalessigsäure als eine oder einige der analysierten Säuren wieder, also ein Defizit von 80 %. In Leber ergibt sich ein Defizit von 50 %, in Muskel von 30 %. Dies zeigt, dass unter gewissen Versuchsbedingungen in diesen drei Geweben *in vitro* ein grosser Teil der zugesetzten Oxalessigsäure anders umgesetzt werden kann als durch Reduktion zu Apfelsäure. Ein Mangel an Breuschs Versuchen ist, dass er nicht auch Bs und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure analysiert hat. Nach Szent-Györgyis Theorie

ist Bs-Analyse von geringerer Bedeutung, da die entstandene Bs so schnell zu Fumarsäure dehydriert wird, dass von diesen beiden Säuren in den Geweben praktisch die ganze Menge als Fumarsäure vorkommt. — WIELAND et al. (1939) finden, dass Oxalessigsäure von Taubenbrustmuskulatur *in vitro* höchstens mit 30 % zu Apfelsäure reduziert wird. Andere Versuche mit Muskulatur *in vitro* zeigen, dass nicht nur Oxalessigsäure, sondern auch Bs, Fumarsäure und Apfelsäure Brenztraubensäure bilden. Um Brenztraubensäure nachzuweisen, muss deren weitere Umsetzung hierbei verhindert werden, indem man die gebildete Ketosäure mit Semicarbazid abfängt (HAHN 1932). *Es ist also äusserst unsicher, ob Oxalessigsäure in vitro in dem Umfang durch Reduktion umgesetzt wird, wie Szent-Györgyi es geltend machen will.*

ad 6. Eine Steigerung der respiratorischen Quote braucht keine Kohlehydratverbrennung anzuzeigen, sondern *kann u. a. auch Verbrennung von Fumarsäure andeuten* (siehe KREBS u. EGGLESTON 1940).

ad 7. Bei der enzymatischen Triosephosphatdehydrierung kann der Wasserstofftransport zum Sauerstoff auch ohne das C<sub>4</sub>-Säurensystem vor sich gehen. In v. Eulers Institut hat POTTER (1940) einwandfrei nachgewiesen, dass die aerobe Oxidation von Triosephosphat *in vitro* durch Malonat nicht gehemmt wird (Triosephosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskulatur, Succinodehydrogenase aus Schweineherz hergestellt). Die hierbei angewandte Malonatkonzentration hemmt dagegen vollständig die Oxydation zugesetzter Bs bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen.

ad 8. Die obige Kritik gilt in zutreffenden Stücken auch für Versuche mit anderen Geweben. Ausserdem hat man mit Szent-Györgyis Methodik gezeigt, dass für *Hirn, Leber* (und Muskel) *in vitro* die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse nicht von so grosser Bedeutung für die Geweboxydation ist, wie Szent-Györgyi es annimmt (BREUSCH 1939, HUSZÁK 1940).

ad 9. Wie aus dem Referat der Versuche Szent-Györgyis und seiner Mitarbeiter hervorgeht (S. 13), ist die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse *in vivo* nicht nachgewiesen. Es fragt sich (siehe oben S. 9), ob Versuche *in vitro* wirklich die physiologischen Verhältnisse spiegeln.

Ausserdem lässt sich gegen die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse auch folgende Kritik richten (MARTIUS 1938). Sowohl die Triosephosphatdehydrogenase als die Malicodehydrogenase benötigen zu

ihrer Wirksamkeit die Anwesenheit von Codehydrase I (Cozymase). Sowohl bei Reduktion von Oxalessigsäure als bei Dehydrierung von Apfelsäure wird der verfügbare Wasserstoff auf Codehydrase I übertragen, die dabei in ihre reduzierte Form übergeht. Bei der  $C_4$ -Säurenkatalyse wird also diese Form zweimal gebildet, erst bei der Reduktion von Oxalessigsäure bei der Triosephosphatdehydrierung und dann bei der Apfelsäuredehydrierung. Es ist daher nach Martius wenig wahrscheinlich, dass die Oxalessigsäure-Apfelsäure-Katalyse ein für den Wasserstofftransport notwendiges Glied darstellt.

Dies sind in Kürze die wichtigsten kritischen Gesichtspunkte, die sich gegen Szent-Györgyis Untersuchungen und die daraus abgeleiteten Theorien anführen lassen. Wir schliessen daraus: *Szent-Györgyis Ansicht über die dominierende Bedeutung der  $C_4$ -Säuren für den Wasserstofftransport kann gegenwärtig nicht anerkannt werden.*

Sowohl Oxalessigsäure als Fumarsäure können als Wasserstoffacceptoren für reduzierte Codehydrogenase I dienen und können also auch als Katalysatoren beim Wasserstofftransport im Sinne Szent-Györgyis wirken. Dies ist keine spezifische Eigenschaft der  $C_4$ -Säuren. So können z. B. Fumarsäure, Oxalessigsäure, Brenztraubensäure, Acetessigsäure oder Acetaldehyd als Wasserstoffacceptor für reduzierte Codehydrogenase I bei der enzymatischen Oxydation von  $\beta$ -Oxybuttersäure in vitro dienen (DEWAN u. GREEN 1937). KNOOP (1938) hebt hervor, dass Metaboliten beim Abbau der Aminosäuren als Wasserstoffacceptoren in vitro wirken können. Sie treten dabei als Katalysatoren auf und schwingen zwischen oxydierten und reduzierten Formen. OPPENHEIMER (1939, S. 1013) ist der Ansicht, dass „vorübergehend während einer gewissen Gleichgewichtslage — z. B. bedingt durch ein bestimmtes Redox-Potential — nunmehr eine *Stoffwechselabbaustufe als Katalysator* fungieren kann, indem sie als reversibles Redoxsystem eine Zeitlang andere Stufen dehydriert und den Wasserstoff weitergibt, bis die Bedingungen andere werden, und diese Stufe von der Rolle eines Katalysators herübergewechselt zu der eines Metaboliten, der selbst in den Abbau hineingezogen wird.“

Nachdem in der obigen Kritik die meisten Argumente Szent-Györgyis für die  $C_4$ -Säurentheorie wiederlegt worden sind, dürfte von diesen nur die Tatsache übrig sein, die Szent-Györgyi ursprünglich die Grundlage seiner Theorie bilden liess: dass

unter gewissen Versuchsbedingungen ein Zusatz von Bs, Fumarsäure oder Apfelsäure *in vitro* eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs hervorruft, welche Steigerung umfassender ist, als es der vollständigen Verbrennung der zugesetzten Säure entspricht. Dieses Ergebnis ist von mehreren Forschern einwandfrei bestätigt worden.

*Die grosse Bedeutung der C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse nach Szent-Györgyi kann gegenwärtig auch nicht für Verhältnisse in vitro anerkannt werden. Die C<sub>4</sub>-Säuren können aber als Katalysatoren beim Wasserstofftransport in vitro fungieren. Eine C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse ist in vivo nicht nachgewiesen.*

### Zielsetzung der Arbeit.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, dass die Rolle, welche die Bs und die übrigen C<sub>4</sub>-Säuren im Organismus, *in vivo*, spielen, uns nicht bekannt ist. Diese Arbeit hatte sich ursprünglich das Ziel gesetzt, die *Umsetzung der C<sub>4</sub>-Säuren in vivo* (am ganzen Tier und bei Organperfusion) zu erforschen, unter besonderer Berücksichtigung ihrer etwaigen Rolle als Metaboliten und Katalysatoren. Im Laufe der Arbeit zwang mich die Grösse des Materials zu einer Begrenzung der Zielsetzung. Die vorliegende Abhandlung umfasst deshalb nur die Umsetzung der *Bernsteinsäure in vivo* sowie die Nachprüfung einiger in diesem Zusammenhang belangvollen Versuche von Szent-Györgyi und seinen Mitarbeitern, eine Untersuchung des hemmenden Einflusses der Malonsäure auf die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäure-Hydrierung.

### Anlage der Arbeit.

Die Voraussetzung eines eingehenderen Studiums der Bs-Umsetzung ist eine leicht zu handhabende, zuverlässige Bestimmungsmethode für Bs. Kap. II berichtet über ältere Methoden sowie über Prinzip und Ausführung einer für die vorliegende Untersuchung ausgearbeiteten neuen Bestimmungsmethode. Genauigkeit und Spezifität der Methode werden erörtert.

Bei der Untersuchung der Bs-Umsetzung wäre es von Bedeutung, *in vivo* die Wirkungen eines Stoffes (Malonsäure) studieren zu können, der *in vitro* die Succinodehydrogenase spezifisch hemmt. Vorher muss aber diese Hemmung der Malon-

säure auf Succinodehydrogenaselösungen näher erforscht werden. Die betreffenden Versuche werden in Kap. III beschrieben.

Es sind für die Versuchstiere geeignete Dosen zu erproben. Soweit dies noch nicht bekannt ist, gilt es festzustellen, dass bei den später verwendeten Dosierungen keine pharmakologischen Wirkungen auftreten, die möglicherweise sekundär Störungen des Stoffwechsels verursachen könnten. Diese Versuche werden in Kap. IV beschrieben.

Nach diesen Vorarbeiten können die endgültigen Umsetzungsversuche am ganzen Tier und bei Organperfusion ausgeführt werden. Planung, Ausführung und Ergebnisse derselben werden in Kap. V behandelt.

---

## KAPITEL II.

# Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Bernsteinsäure<sup>1</sup>.

Soll eine Methode zur Bestimmung von Bs für die geplante Untersuchung brauchbar sein, so muss sie folgenden Anforderungen genügen:

1) Die Empfindlichkeit muss so gross sein, dass man Bs in Konzentrationen, wie sie normal im Serum vorliegen, bis hinauf zu etwa 200  $\gamma$ /ml bestimmen kann (innerhalb dieses Bereichs ungefähr kann man die Serumkonzentrationen bei einer experimentellen Untersuchung wie der unseren vermuten).

2) Hohe Spezifität.

3) Die Methode muss leicht ausführbar sein und sich für Reihenbestimmungen eignen.

4) Für jede Bestimmung darf nur wenig Analysenmaterial benötigt werden.

Der folgende kurze Überblick über die zahlreichen Methoden zur Bestimmung von Bs, die zu verschiedenen Zwecken ausgearbeitet worden sind, zeigt indessen, dass keine von ihnen allen oben gestellten Bedingungen genügt.

PASTEUR (1869) hat als erster nachgewiesen, dass Bs sich normal bei gewöhnlicher Alkoholgärung bildet, und hat eine Methode zur Bestimmung der Säure ausgearbeitet. Seitdem sind viele verschiedene Methoden veröffentlicht worden; die meisten sehen es auf die Analyse von Bs in Wein oder anderen Gärungsprodukten sowie in Obstsäften ab und haben in der Weinindustrie ausgedehnte Verwendung gefunden. Seit THUNBERG (1909) entdeckt hat, dass die Bs auch für den Stoffwechsel tierischer Gewebe von Bedeutung ist, sind neue Methoden speziell für animalisches Analysengut ausgearbeitet worden.

Bei diesen Bestimmungsmethoden sind viele verschiedene Prinzipien

---

<sup>1</sup> Die Methode ist bereits in einer vorläufigen Mitteilung veröffentlicht worden (Forssman 1940).

zur Anwendung gebracht worden. In der Mehrzahl der Fälle hat man sich die Löslichkeitsverhältnisse der Bs und gewisser Succinate zunutze gemacht. Bs ist in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich und lässt sich mit Leichtigkeit aus saurer wässriger Lösung mit Äthyläther extrahieren. Ätherextraktion von Bs in dieser Weise ist ein Glied der meisten Analysenmethoden. Was die Löslichkeit der Succinate angeht, so ist in diesem Zusammenhang folgendes von Interesse<sup>1</sup>: Calcium- und Bariumsuccinat ist in Wasser löslich bzw. ziemlich löslich, beide aber sind sehr schwerlöslich in 70—80 %-igem Alkohol. Das Silbersuccinat ist in wässriger Lösung äusserst schwerlöslich. Bs kann aus nicht allzu schwachen Lösungen durch Zusatz von Ferrichlorid quantitativ als basisches Ferrisuccinat gefällt werden. Bleisuccinat ist in Wasser schwerlöslich. Viele Analysenmethoden fussen auf dem Ausfällen von Bs in Form eines dieser schwerlöslichen Succinate, bisweilen mit Extraktion von Bs mit Äther oder Alkohol kombiniert. Die endgültige Bestimmung erfolgte dann in der Regel gravimetrisch. (ALBAHARY 1907; ASLANOGLU 1896; BORDAS u. a. 1898; GREY 1908; HARDEN 1901; JÖRGENSEN 1907; KAYSER 1882; KEIM 1891; LABORDE 1918; MACAGNO 1875; MÜLLER 1896; MUSSET 1885; PASTEUR 1864; RAU 1893; SCHMITT u. HIEPE 1882.)

Die Bs allein durch Extraktion und Ausfällen von den übrigen organischen Säuren, die in biologischem Analysengut vorkommen können, zu scheiden, ist sehr schwer. Es bedeutete deshalb einen grossen Schritt vorwärts, als man entdeckte, dass man sich die grosse Widerstandskraft der Säure gegen starke Oxydationsmittel für ihre Bestimmung zunutze machen kann (KUNZ 1903). Es wurden dann zahlreiche Methoden ausgearbeitet, die teils Kaliumpermanganat oder Dichromat-Schwefelsäure verwenden, um störende organische Stoffe zu verbrennen, teils gleichzeitig das Fällungs- und Extraktionsverfahren wie oben heranziehen. (BONIFAZI 1929; BOTTINI 1938; GLIMM u. NITSCHKE 1932; HEIDE u. STEINER 1909; HEIDUSCHKA u. QUINCKE 1907; MESTREZAT 1906; NUCCONI u. ZACCAGNINI 1932; POZZI-ESCOT 1908; SÉMICHON u. FLANZY 1932.)

Die obigen Methoden sind in der Regel für die Analyse von Wein oder Obstsaften bestimmt. Einige auf den obengenannten Prinzipien fussende Methoden sind besonders für die Bestimmung von Bs in tierischem Material (Gewebe, Plasma u. dgl.) ausgearbeitet. Die zuverlässigsten von diesen haben MOYLE (1924) und MASSART u. GREMBERGEN (1938) veröffentlicht. MOYLES Methode erfordert verhältnismässig grosse Mengen Analysenmaterial. M. findet mit seiner Methodik von 4—5 mg Bs, die er der Muskulatur zusetzt, 95 %  $\pm$  5 % wieder. Die beiden letzteren Forscher arbeiten mit kleineren Mengen Ausgangsmaterial und können 0,1—0,6 mg Bs in Muskelgewebe mit einem Fehler von etwa  $\pm$  10 % bestimmen. Diese beiden Methoden sind nicht ganz spezifisch. Ihre Genauigkeit reicht für unsern Zweck nicht aus, und die Menge des für eine Analyse benötigten Ausgangsmaterials ist allzu gross.

<sup>1</sup> Eine Übersicht über die Löslichkeit verschiedener Succinate findet sich bei RAU (1893).

Es liegen noch einige weitere Methoden vor, die sich jedoch auf ganz andere Prinzipien als die obengenannten gründen. SUCHTELEN u. ITANO (1914) bestimmen den Bs-Gehalt von Wein, indem sie die Leitfähigkeit bei Titration mit Bariumacetat teils bloss in wässriger Lösung, teils in stark essigsaurer Lösung messen. Aus dem Unterschied zwischen diesen beiden Titrationen können die Verff. den Bs-Gehalt berechnen. Diese Methode erfordert so hohe Bs-Konzentrationen, dass sie hier nicht in Frage kommen kann. OECHSNER DE CONINCK (1913) hat gefunden, dass Bs in wässriger Lösung mit Calciumsalicylat eine rosa Färbung ergibt, die sogar in Wärme stabil ist. Da diese Farbreaktion nach dem Verf. nur in „konzentrierten“ Bs-Lösungen auftritt, dürfte sie für diese Untersuchung nicht verwertbar sein. NEUBERG (1900) hat gezeigt, dass Bs sich leicht in Pyrrol überführen lässt und dass diese Pyrrolreaktion noch für 0,6 mg Bs sichtbar sei. Doch ist, wie NEUBERG selbst hervorhebt, diese Reaktion nicht ganz spezifisch. Pyrrol bilden unter denselben Versuchsbedingungen auch Fumarsäure, Apfelsäure, Citronensäure und Aeonitsäure. Nach VIRTANEN u. FONTELL (1926) liefern auch Milchsäure, Brenztraubensäure, Dioxyacetone und Acetaldehyd diese Reaktion. Diese äusserst empfindliche Probe liesse sich sicherlich für die Bestimmung erheblich kleinerer Bs-Mengen einrichten, als sie die ursprüngliche Arbeit im Auge hatte. Ihre geringe Spezifität würde es jedoch notwendig machen, dass der endgültigen Bestimmung eine sorgfältige Isolierung der Bs von den störenden Stoffen voranginge. ULSCH (1899) hat Bs bestimmt, indem er die Wasserstoffmenge mass, die sich bei Einwirkung von platinisiertem Eisen, Ferrum pulv. und Platinechloridlösung auf Bs bildet. Auch Essigsäure und Oxalsäure werden auf diese Weise bestimmt, und die geringe Spezifität der Methode macht sie also für Bestimmungen der hier gewünschten Art unbrauchbar.

Seitdem man entdeckt hat, dass Bs von den meisten tierischen Geweben zu Fumarsäure dehydriert wird und dass diese Dehydrierung mit Hilfe eines für Bs spezifischen Enzyms, der Succinodehydrogenase, erfolgt, hat man versucht, diese enzymatische Reaktion für die Bestimmung der Bs auszuwerten. THUNBERG (1916, 1938) hat teils Methylenblau, teils Thionin als Wasserstoffaceceptor verwendet und gewaschene Muskulatur oder Muskelextrakt als Enzympräparat. Der Verf. vergleicht im Thunberg-Versuch die Dehydrierung einer bekannten Menge Succinat und der Probelösung. Mit dieser Methode kann man Mengen bis hinunter zu wenigen  $\gamma$ /ml bestimmen. Der absolute Fehler ist nicht direkt angegeben. Thunberg hat mit dieser Methode den Bernsteinssäuregehalt des Serums und des Liquor cerebrospinalis bestimmt und ihn mit 6—7  $\gamma$ /ml bzw. 3—4  $\gamma$ /ml ermittelt. Indessen muss man, wenn man mit der Thionin-Methode diese hohe Empfindlichkeit erreichen will, ein sehr umständliches Verfahren anwenden.

GLUTTERBUCK (1927) lässt Muskelgewebe Bernsteinssäure über Fumarsäure zu Apfelsäure unwandeln, worauf die so gebildete Menge dieser optisch aktiven Säure nach Zusatz von Uranylacetat polarimetrisch be-



stimmt wird. Diese Methode ist auch nicht genügend empfindlich. SZENT-GYÖRGYI hat in seinem Institut eine Methode ausarbeiten lassen (GÖZSY, 1935), die sich auf die Fähigkeit gewaschener Muskulatur stützt, nach Zusatz von Bernsteinsäure Sauerstoff zu verbrauchen, wobei der Verbrauch in direktem Verhältnis zur Succinatmenge steht. Der Sauerstoffverbrauch wird nach Warburg gemessen. Die kleinste Menge Bernsteinsäure, die Szent-Györgyi auf diese Weise analysieren konnte, war 0,2 mg (200  $\gamma$ ) mit einem Fehler von 50 %. Der absolute Fehler war also 100  $\gamma$ . Diese Methode ist von KREBS und von WEIL-MALHERBE technisch verbessert worden. Der erstere hat als kleinste Menge in einem einzelnen veröffentlichten Versuch 250  $\gamma$  mit einem Fehler von 1 % bestimmt, der letztgenannte Autor entsprechend 600  $\gamma$ . In keinem dieser Fälle ist der Versuch gemacht worden, den mittleren Fehler der Methode festzustellen. In Anbetracht der Methodik für die Messung des Sauerstoffverbrauchs kann man den absoluten Fehler in beiden Fällen auf mindestens 20  $\gamma$  schätzen.

Wir können also zusammenfassend feststellen, dass von den Methoden zur Bestimmung von Bernsteinsäure nur die von Thunberg angegebene eine ausreichende Genauigkeit ermöglicht, dass diese Methode jedoch wegen ihrer Umständlichkeit für die Analyse grösserer Probenreihen, was bei Stoffwechselversuchen notwendig sein kann, nicht geeignet ist.

### Das Prinzip der neuen Methode.

Es ist von vornherein unwahrscheinlich, dass sich bei diesen niedrigen Bs-Konzentrationen eine Bestimmungsmethode auf das Ausfällen von Bs in Form eines schwerlöslichen Succinats gründen könnte. Eine Voruntersuchung über die Löslichkeit der bisher für die Bs-Analyse benutzten Succinate (Ca- und Ba-Succinat in Alkohol, Silber- und Bleisuccinat, bas. Ferrisuccinat) zeigte auch, dass keines von ihnen so schwerlöslich ist, dass es für die Bs-Bestimmung bei den Konzentrationen, um die es sich hier handelt, brauchbar wäre. Neubergs Pyroloreaktion ist, wie schon gesagt, wegen ihrer geringen Spezifität nicht geeignet. Es bleibt also nur die Möglichkeit, eine neue biologische Methode auszuarbeiten oder eine der oben angegebenen umzuarbeiten.

Nachdem ich mehrere verschiedene Prinzipien geprüft hatte, fand ich das von J. LEHMANN (1938) zur Bestimmung von Milchsäure angewandte am besten. Die in der Probe befindliche Menge Bernsteinsäure wird hier von Succinodehydrogenase zu Fumarsäure dehydriert, mit Ferricyanid als Wasserstoff-acceptor. Für jedes Molekül dehydrierte Bernsteinsäure bilden sich 2 Moleküle Ferrocyanid. Nach beendigter Reaktion wird

die Menge des gebildeten Ferrocyanids titrimetrisch mit Cerisulfat und mit Setoglaucin als Redoxindikator bestimmt. Da die Enzymlösung selbst etwas Ferricyanid reduziert, werden für jede Probe 2 Bestimmungen ausgeführt: teils Enzym + Analysenprobe, teils Enzym + entsprechende Menge Wasser. Der Unterschied zwischen den Analysenergebnissen dieser beiden Bestimmungen stellt die Menge der Bernsteinsäure in der Probe dar. Bei gleichzeitiger Analyse mehrerer Proben kann man natürlich eine und dieselbe Enzym-Wasser-Kontrolle benutzen.

Der Vorteil des Ferricyanids als Wasserstoffacceptor liegt u. a. darin, dass das Redoxpotential des Systems Ferrocyanid/Ferricyanid im Verhältnis zum Potential des Systems Succinat/Fumarat/Succinodehydrogenase so positiv ist, dass kein Gleichgewicht eintreten kann. Die Reaktion muss also quantitativ geschehen.

Voraussetzung für eine Bs-Bestimmung in dieser Weise ist es, dass die Enzymlösung keines der Stoffwechselprodukte der Bernsteinsäure dehydriert. Die bei der Dehydrierung der Bs gebildete Fumarsäure setzt sich mit Hilfe der in diesen Enzymlösungen vorkommenden Fumarase zum Teil in Apfelsäure um, die indessen nicht weiter umgesetzt wird. Die Bildung von Apfelsäure aus Fumarsäure ist keine Oxydation, sondern eine Wasseraddition, somit kein Hindernis für die Bestimmung von Bs nach dem obigen Prinzip.

Es kann sogar einen Vorteil bedeuten, dass der Gehalt an Fumarsäure, dem primären Reaktionsprodukt bei der Dehydrierung der Bs, dadurch vermindert wird, dass sich ein Teil in Apfelsäure umsetzt. Bei der Dehydrierung grösserer Bs-Mengen ist zu erwarten, dass die gebildete Fumarsäure durch Adsorption an das Enzym allmählich die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamen wird. Diese Gefahr ist bedeutend kleiner, wenn man fumarasehaltige Succinodehydrogenaselösungen verwendet.

Bei blosser Verwendung von Ferricyanid als Wasserstoffacceptor erhält man indessen oft unrichtige Werte. Zwischen den Potentialen der beiden Redoxsysteme herrscht ein solcher Sprung, dass es denkbar ist, dass die Übertragung des Wasserstoffs dadurch erschwert wird. Unter physiologischen Verhältnissen nimmt man einen Transport des bei der Dehydrierung freigemachten Wasserstoffs über eine Anzahl Redoxsysteme mit ansteigendem Redoxpotential vor Erreichung des endgültigen Wasserstoffacceptors, des Sauerstoffs, an. Analog hierzu

wurde nun ein Redoxindikator zugesetzt, dessen Potential zwischen dem des Ferricyanid- und dem des Succinat-Systems liegt. Nach Prüfung mehrerer Indikatoren stellte es sich heraus, dass 2 : 6-Dichlorophenolindophenol richtige Resultate ergibt, auch da, wo man ohne Farbzusatz zum Ferricyanid falsche Werte für bekannte Succinatmengen erhielt.

Wie spätere Untersuchungen gezeigt haben, ist indessen die theoretische Grundlage der Farbwirkung nicht ganz die oben beschriebene. Sie ist bisher noch nicht völlig klargestellt und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Seit langem ist es bekannt, dass Succinodehydrogenaselösungen von der Art der bei diesen Versuchen angewandten (s. unten) bei Zusatz von Succinat Sauerstoff verbrauchen. Könnte bei Bestimmung nach dieser Methode der Sauerstoff der Luft ganz oder teilweise als Wasserstoffacceptor dienen, so wäre die Analyse natürlich wertlos. Ein Arbeiten im evakuierten System, wie bei Thionin- oder Methylenblau-Versuchen, würde das Verfahren erheblich komplizieren. Deshalb wurden die ersten Versuche statt dessen mit einem Zusatz von Cyanid in einer Konzentration ausgeführt, bei der die Cytochromoxydase und damit der Sauerstoffverbrauch vollständig gehemmt wurde. Es zeigte sich jedoch, dass bei Vorhandensein von Ferricyanid im *Überschuss* ohne Cyanid-Zusatz kein Sauerstoff verbraucht, sondern der Wasserstoff quantitativ auf das Ferricyanid übertragen wurde. Dies lag jedoch nicht an einer Hemmung der Cytochromoxydase, denn setzt man statt dessen Succinat im *Überschuss* zu, also mehr als der anwesenden Menge Ferricyanid entspricht, so findet ein Sauerstoffverbrauch statt.

Der Sauerstoff der Luft stört also, bei Vorhandensein von Ferricyanid im *Überschuss*, die Reaktion nicht.

## Reagenzien und Lösungen.

*Kaliumferricyanidlösung:* 0,05-molare *Stammlösung*. 3,292 g Kaliumferricyanid (Kahlbaum zur Analyse) wird mit Aqua redest. auf 200 ml verdünnt.

*Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung:* 20 ml Kaliumferricyanid-Stammlösung + 10 ml 2 : 6-Dichlorophenolindophenollösung 1 : 2000 werden mit M/15 Sörensen-Phosphat pH 7,38 auf 100 ml verdünnt.

*Farblösung:* 2 : 6-Dichlorophenolindophenol 0,050 g werden in 100 ml Aqua redest. gelöst. Die Lösung muss 24 Stunden in Zimmertemperatur stehen, bevor sie filtriert und gebraucht wird. An dunkler Stelle aufzubewahren.

*M/15 Phosphat pH 7,38:* 9,501 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, nach Sörensen) und 1,816 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, nach Sörensen), Aqua redest. ad. 1 l.

*Mohrs Lösung:* 0,02-molare *Stammlösung*. 0,7844 Mohrs Salz (Merck, Ferro-Ammonium sulfuricum pro Analysis +  $6\text{H}_2\text{O}$ ) + 5 ml 18-n Schwefel-

säure, verdünnt mit Aqua redest. ad 100 ml. An dunkler Stelle aufzubewahren.

0,001-molare Lösung: 5 ml Stammlösung + 5 ml 18-n Schwefelsäure werden mit Aqua redest. auf 100 ml verdünnt. An dunkler Stelle aufzubewahren.

*Indikatorlösung:* 0,10 g Setoglaucin (Setoglaucin salzfrei, I. R. Geigy, S. A., Basel) in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung muss 24 Stunden stehen, bevor sie filtriert und gebraucht wird.

*18-n Schwefelsäure:* 465 ccm konz. Schwefelsäure (Acidum sulfuricum 1,84 pro analysi Merck) werden vorsichtig zu 535 ml Aqua redest. gesetzt.

*Cerisulfatlösungen:* Etwa 5 g Cerisulfat (Merck, Cerium sulfuric. oxydatum pro analysi) werden unter Erwärmung in 400 ml 1,8-n Schwefelsäure gelöst, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt, filtriert und mit Aqua redest. ad 500 ml verdünnt. Der Titer wird gegen 0,02-molare Mohrsehe Stammlösung gestellt: 10 ml der letzteren werden mit der Pipette in einen Kolben gegeben und mit 3 ml 18-n Schwefelsäure, 5 Tropfen Indikator und 20 ml Wasser versetzt. Dann wird mit der Ceri-Stammlösung titriert, bis zum deutlichen Farbumschlag. Der Titer ist etwa 0,03-molar. 100–200 ml dieser Lösung werden zu etwa 0,02-molarer Lösung verdünnt. Der Titer wird auf gleiche Weise wie für die Stammlösung kontrolliert.

0,001-molare Lösung: 5 ml 0,02-molare Cerisulfatlösung + 5 ml 18-n Schwefelsäure werden mit Aqua redest. ad 100 ml verdünnt. Diese Lösung muss frisch hergestellt sein. Der Titer wird gegen 0,001-molare Mohrsehe Lösung gestellt. 2 ccm von dieser werden (mit ausgewogener Pipette) in ein Titrierröhrchen gegeben und mit 3 ccm 18-n Schwefelsäure, 3 ccm Wasser und 3 Tropfen Indikatorlösung versetzt. Darauf wird bis zu deutlichem Umschlag mit 0,001-molarer Cerilösung aus einer Mikrobürette titriert.

*30 %ige Trichloressigsäurelösung:* 30 g Acidum trichloroaceticum (Merck) + Aqua redest. ad 100 ml.

*0,02-molare Natriumsuccinatlösung:* 0,2361 g Acidum succin. pro analysi (Merck) + 40 ml 0,100-n NaOH werden mit Aqua redest. ad 100 ml verdünnt.

0,001-molare Lösung: 5 ml 0,02-molare Succinatlösung werden mit Aqua redest. ad 100 ml versetzt. Diese Lösung enthält pro ml 118,17 Bernstein-säure. Lösungen mit 59; 29,5; 14,8; 7,4  $\gamma$ /ml werden durch wiederholtes Versetzen mit gleichen Teilen Wasser erhalten.

*Enzymlösung:* Diese Lösung wird nach J. LEHMANN (1929) dargestellt. Von Fett und Sehnen befreites Pferdefleisch, am besten von einem älteren Tier, wird dreimal durch die Fleischmühle gegeben und dann mit etwa der doppelten Menge destillierten Wassers im Mörser verrührt. Nach etwa 15 Minuten wird die Muskulatur in einem Gazetuch fest ausgedrückt. Diese Prozedur wird fünfmal wiederholt. Zu a g gewaschener Muskulatur werden 2 a ml M/15 Dinatriumphosphat gegeben. Die

Phosphatlösung wird in kleinen Mengen unter ständigem Umrühren im Mörser zugesetzt. Nachdem alle Phosphatlösung zugesetzt ist, wird das Gemisch dann und wann  $\frac{1}{2}$  Stunde lang gerührt und dann 10—15 Min. energisch zentrifugiert. Die Aktivitätsprüfung und Bestimmung der Spontanreduktion wird nach J. LEHMANN (1930) im Thunberg-Versuch ausgeführt.

Zur Aktivitätsprobe wird folgendes Reaktionsgemisch verwendet:

M/15 Phosphatpuffer pH 7,3 .....	2,0 ml
M/5 Natriumsuccinat .....	0,2
Methylenblau-Lösung 1 : 2000 (150 $\gamma$ ) .....	0,3
Enzymlösung .....	0,5

Zur Bestimmung der Spontanreduktion:

M/15 Phosphatpuffer pH 7,3 .....	2,0 ml
Methylenblau-Lösung 1 : 33333 (15 $\gamma$ ) .....	0,5
Enzymlösung .....	0,5

Als Mass der Aktivität und Spontanreduktion wird die Entfärbungszeit in Minuten bei Entfärbung bei 37° angegeben.

Die Enzymlösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und hält sich in der Regel 4 Tage.

### Ausführung der Bestimmung.

Zu 1 ml der Probe werden in einer Zentrifugenröhre 1 ml Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung und 0,5 ml Enzymlösung gegeben. Die gleichen Mengen werden der Enzym-Wasser-Kontrolle zugesetzt, statt der Probe wird hier jedoch 1 ml Wasser genommen. Es empfiehlt sich, Doppelproben zu machen. Nachdem die Röhren 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln gestanden haben, setzt man 0,5 ml 30 %ige Trichloressigsäure zu. Nach 10 Min. wird die Lösung 7 Min. lang zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min.). Aus jeder Röhre werden (mit ausgewogener Pipette) 2 ml in Titrierröhren mit flachem Boden abpipettiert. (Dimension der Titriergläser; siehe LEHMANN 1938.) Jede Röhre wird mit 3 ml 18-n Schwefelsäure, 3 ml Wasser und 3 Tropfen Indikatorlösung versetzt. Dann wird mit etwa 0,001-molarer Cerisulfatlösung aus einer Mikrobürette titriert. Am besten verwendet man hierbei Druckluft zum Umrühren. Das Ablaufrohr der Cerisulfatlösung, das zu einer Kapillare ausgezogen ist, muss unterhalb des Flüssigkeitsspiegels nahe dem Boden neben der Mündung des Druckluftrohrs münden. Unter gutem Umrühren lässt man

nun die Cerisulfatlösung langsam in die Titrierröhre sickern, und bei deutlichem Umschlag wird der Hahn der Bürette geschlossen. In zweifelhaften Fällen muss man sich überzeugen, dass wirklich Umschlag vorliegt, indem man nach Ablesen der Bürette noch mehr Cerisulfatlösung zusetzt.

Der Titer der Cerisulfatlösung wird gegen 2 ml 0,001-molare Mohrsche Lösung gestellt, mit Zusatz von 18-n Schwefelsäure, Wasser und Indikator wie oben.

*Ausrechnung:* Der Unterschied zwischen der verbrauchten Menge Cerisulfatlösung für die Probe und für die Enzym-Wasser-Kontrolle gibt die Menge der Bernsteinsäure in der Probe an. Jedes Molekül dehydrierte Bernsteinsäure entspricht 2 Molekülen Ferroeyanid und damit 2 Molekülen Cerisulphat. Ein Verbrauch von 1 ml 0,001-molarer Cerisulfatlösung entspricht also 0,5 ml 0,001-molarer Succinatlösung oder  $\frac{118,1}{2} \gamma$  Bernsteinsäure. Da von 3 ml Reaktionsgemisch zum Titrieren 2 ml abpipettiert werden, muss man die Zahl der Milliliter verbrauchte Cerisulfatlösung mit  $\frac{3}{2}$  multiplizieren, um die Bernsteinsäuremenge in der *ganzen* Reaktionsmischung zu erhalten. Der gefundene Titer der Cerisulfatlösung ist etwa 0,001-molar. Der Cerisulfatverbrauch muss daher für den entsprechenden Verbrauch einer exakt 0,001-molaren Lösung umgerechnet werden. Was durch Multiplikation mit dem Titerfaktor 2/bei der Titerstellung verbrauchte Cerisulfatlösung geschieht. Werden beim Stellen des Titers  $a$  ml Cerisulfatlösung (zweckmässig Mittelwert aus 3—4 Bestimmungen) verbraucht, so ist der schliessliche Faktor also folgender:

$$\frac{3 \cdot 118,1}{2 \cdot 2} \cdot \frac{2}{a} = 88,575 \cdot \frac{2}{a}$$

Multipliziert man die Anzahl ml Cerisulfatlösung, die der Succinatmenge der Probe entspricht, mit diesem Faktor, so erhält man das Resultat direkt in  $\gamma$  Bernsteinsäure. Die Ausrechnung sei durch folgendes Beispiel veranschaulicht, bei der als „Probe“ 0,001-molare Natriumsuccinatlösung diene.

Röhre Nr.	1	2	3	4
ml 0,010-m. Ferricyanid-Farb-Puffer-Lösung . . . . .	1,0	1,0	1,0	1,0
0,001-m. Natriumsuccinat . . . . .	1,0	1,0	—	—
Aqua redest. . . . .	—	—	1,0	1,0
Enzymlösung . . . . .	0,5	0,5	0,5	0,5
30 % Trichloressigsäure (nach 1 Stde. zugesetzt)	0,5	0,5	0,5	0,5
Cerisulfatverbrauch . . . . .	1,898	1,894	0,545	0,530
Mittelwert		1,896		0,537

ml Cerisulfatverbrauch beim Stellen des Titers: 2,040  
 2,046  
 2,026  


---

 Mittelwert 2,037

$$\text{Faktor: } 88,575 \cdot \frac{2}{2,037} = 88,575 \cdot 0,9818 = 86,96.$$

ml Cerisulfatlösung entsprechend der Menge der Bernsteinsäure in der Probe:

$$1,896 - 0,537 = 1,359.$$

Ergebnis der Analyse:  $86,96 \cdot 1,359 = 118,2 \gamma$  Bernsteinsäure

In der Probe anwesende Menge Bernsteinsäure: ..... 118,1 $\gamma$

Differenz: ..... 0,1 $\gamma$

Proz. Fehler: ..... 0,1 %

### Standardisierung der Versuchsbedingungen.

*Volumen des Reaktionsgemischs:* Die Methode ist standardisiert worden, so dass das Gesamtreaktionsvolumen 3 ml beträgt. Dadurch ist es möglich, 2 ml zum Titrieren zu verwenden, so dass der Cerisulfatverbrauch nicht zu gering und der Titrierfehler nicht relativ gross wird. Gleichzeitig wurde bis zu 1 ml der Probelösung verwendet; bei hoher Succinatkonz. wurde entweder verdünnt oder eine kleinere Menge zugesetzt, wobei das Volumen mit destilliertem Wasser auf 1 ml gebracht wurde. Es ist ein Vorteil, eine so grosse Menge Analysenmaterial zu verwenden, da die Succinatmenge z. B. des Serums normal so gering ist.

*Ferricyanidkonzentration:* Es wäre selbstverständlich von Vorteil, eine möglichst grosse Menge Ferricyanid zu verwenden. Die Bestimmung könnte dann bei höherer Bs-Konzentration als sonst ausgeführt werden. Doch ist es nicht möglich, beliebig hohe Ferricyanidkonzentrationen zu haben, da höhere Konzentrationen die Succindehydrogenase hemmen, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Jedes Röhrchen ist mit 1,0 ml 0,001-mol. Succinat versetzt = 118,1  $\gamma$  Bs. Jeder Wert ist der Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

TABELLE 1.

Molarität Ferricyanid in der Ferricyanid- Farbstoff-Pufferlösung	Gefundener Wert $\gamma$ Bs	
	nach 1stündiger Reaktion	nach 2stündiger Reaktion
0,020	98	116
	102	113
0,0150	96	
	109	
0,0125	108	
	120	
0,0100	120	
	121	
0,0075	121	
0,0050	119	

Die zugesetzte Bs wird quantitativ bei Ferricyanidkonzentrationen zwischen 0,005-m. und 0,010-m. wiedergefunden. Bei einer Konzentration von 0,0125-m. ergibt sich mit einer Enzymlösung ein Verlust von 9 %, mit einer anderen dagegen ein Analysenresultat, das gut mit der zugesetzten Bs-Menge übereinstimmt. Bei höheren Konzentrationen, 0,015-m. und 0,020-m., ist die Dehydrierung von Bs etwas gehemmt, doch nicht stärker, als dass die Umsetzung von 118  $\gamma$  praktisch nach 2 Stunden abgeschlossen ist. 0,010-m. Ferricyanid dürfte die für unsern Zweck geeignetste Konzentration sein. (Die angegebenen Konzentrationen betreffen sämtlich die Konzentration in der „Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung“; siehe S. 30).

*Sauerstoff ohne Einwirkung:* Wie oben gesagt, braucht man den Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Ferricyanid im Überschuss nicht zu hemmen, da aller durch die Dehydrierung freiwerdende Wasserstoff auf das Ferricyanid als Wasserstoff-acceptor übergeführt wird. Dies zeigt schon die Tatsache, dass man bei Bestimmung zugesetzter bekannter Bs-Mengen in Gegenwart von Ferricyanid in Überschuss richtige Analyseergebnisse erhält. Ausserdem kann man durch Messen des Sauerstoffverbrauchs feststellen, ob ein Zusatz von Succinat unter unsern Versuchsbedingungen eine Steigerung desselben hervorruft.

Der Sauerstoffverbrauch wird mit dem offenen Manometer nach Warburg gemessen. Der Rezipient ist teils mit „KOH-Einsatz“, teils mit Seitenrohr versehen. Volumen etwa 16,5 mm. Vgl. KREBS (1929), S. 637,



Bild 305. Zusätze in gleicher Proportion wie bei der Bs-Bestimmung: 1 ml Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung (mit 0,01-m. Ferricyanid), 0,5 ml Enzymlösung, 0,2—0,3 ml Succinat im Seitenröhrchen, im Rezipienten Aqua redest. ad 2,5 ml, im „KOH-Einsatz“ 0,3 ml 5 % KOH.

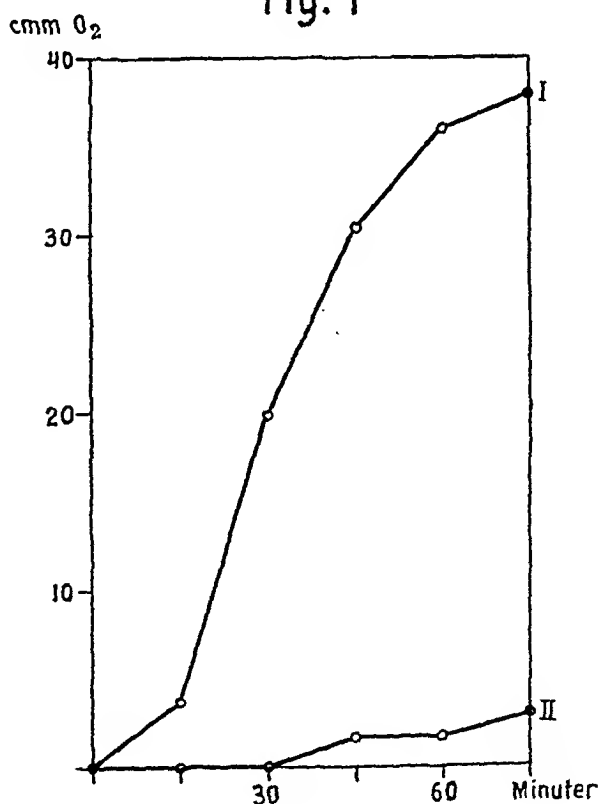
Atmosphäre: Luft. Schütteln: Amplitude  $\pm 20$  mm. Frequenz 100/Min. Ableseperioden: 15 Minuten. Temperatur  $37,0^{\circ}$ .

TABELLE 2.

<i>cmm O<sub>2</sub></i> während 7 Ableseperioden (105 Min.).	<i>Zusatz im Seitenröhrchen.</i>
7,7 7,7	0,2 ml Succinat 0,02 mol.
7,9 7,4	0,2 ml aqua redest.

Die obige Tabelle zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch nach Zusatz von Succinat nicht ansteigt, wenn Ferricyanid im Überschuss anwesend ist.

Fig. 1



0,005-m. Ferricyanid in der Ferricyanid-Farb-Puffer-Lösung. Temperatur 27°. I: Im Seitenröhrchen 0,3 ml 0,02-m. Succinat. II: Kontrollversuch statt dessen Aqua redest.

Aus der Kurve ersieht man, dass der Sauerstoffverbrauch erst während der zweiten Ableseperiode stark zunimmt. Wird der Sauerstoffverbrauch mit diesen Enzymlösungen ohne Ferricyanidzusatz bei im übrigen gleichbleibenden Versuchsbedingungen registriert, so sieht man, dass er von Anfang an hoch ist und dann schnell abnimmt. (Siehe z. B. AHLGREN, 1938.) Höchstwahrscheinlich liegt dies daran, dass der Sauerstoffverbrauch erst einsetzt, nachdem alles Ferricyanid reduziert ist.

Solange Ferricyanid im Überschuss vorhanden ist, kann also der Sauerstoff als konkurrierender Wasserstoffacceptor die Bs-Bestimmung nicht stören. Weitere Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (z. B. durch Cyanid) erübrigt sich deshalb.

*Zusatz von 2:6-Dichlorophenolindophenol:* Viele Enzyme liefern, wenn ausschliesslich Ferricyanid als Wasserstoffacceptor verwendet wird, bei Bs-Analysen falsche Werte, entweder zu niedrige oder — und zwar meist — zu hohe. Am nächstliegenden ist es, dies so zu erklären, dass ein kleiner Teil der bei der Bs-Umsetzung über Fumarsäure gebildeten Apfelsäure dehydriert wird. Die Enzymlösung enthält Malicodhydrogenase. Um wirksam sein zu können, braucht dieses Enzym die Anwesenheit eines Coenzym (Codehydrogenase I). Ungenügendes Waschen der Muskulatur bei der Enzympreparation könnte die Ursache sein, dass die Enzymlösung kleine Mengen dieses Coenzym enthält. In einem solchen Fall müsste man mit einer gewissen Dehydrierung der Apfelsäure rechnen. Bei der Ceri-Titration würde dann Cerisulfat entsprechend der Dehydrierung teils der Bs, teils einer kleinen Menge Apfelsäure verbraucht. Man würde im Verhältnis zu der in der Probe vorhandenen Bs-Menge einen zu hohen Ceriverbrauch erhalten.

Die nachstehende Tabelle bietet ein typisches diesbezügliches Beispiel: ein Enzym, das ohne Farbstoffzusatz einen zu hohen, mit Farbstoffzusatz den richtigen Bs-Wert gibt. Gleichzeitig zeigt es sich, dass *keine oder nur eine geringfügige Dehydrierung von Apfelsäure stattfindet*. Jedenfalls ist sie nicht von solcher Stärke, dass sie die zu hohen Bs-Werte erklären könnte.

TABELLE 3.

	Analysergebnis: $\gamma$ Bs	
	mit Farbstoff, 50 $\gamma$ ml	ohne Farbstoff
Zusatz $\gamma$ Bs 118,1	120	130
» $\gamma$ Apfelsäure 134,1	3,2	0,8

(Sämtliche Werte, mit Ausnahme der Malat-Bestimmung „mit Farbstoff“, sind Mittelwerte zweier Analysen.)

Eine experimentell begründete Erklärung der zu hohen Werte bei Bs-Bestimmung ohne Farbstoffzusatz für gewisse Enzyme oder der Natur der Farbstoffwirkung vermag ich gegenwärtig nicht zu geben. Beide Erscheinungen werden indessen den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass der beste Farbstoffgehalt (in der Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung) 50  $\gamma$ /ml (= 1 : 20000) ist. Auch 70  $\gamma$ /ml gibt richtige Bs-Werte. Steigert man die Farbstoffkonzentration beträchtlich darüber hinaus, so ergeben sich unregelmässige, bisweilen falsche Analysenresultate. Doch darf der Farbstoffgehalt nicht weniger als 50  $\gamma$ /ml sein, wie nachstehende Tabelle zeigt.

Zusatz $\gamma$ Bs	Analysergebnis; $\gamma$ Bs			
	ohne Farbstoff	mit Farbstoff 15 $\gamma$ /ml	30 $\gamma$ /ml	50 $\gamma$ /ml
118,1	133	129	126	121

(Sämtliche hier angegebenen Resultate sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen.)

Wir haben bei der Bs-Bestimmung eine Farbstoffkonzentration von 50  $\gamma$ /ml verwendet (wie oben gesagt, ist hier die Farbstoffkonzentration der Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung gemeint, nicht die des Reaktionsgemisches).

Bei der Ausarbeitung der Bs-Bestimmungsmethode erhielten wir anfangs in einzelnen Fällen Enzyme, die trotz diesem Farbstoffzusatz bei den Kontrollanalysen zu hohe Bs-Werte lieferten. Wir nahmen an, dass die unbekannte Ursache dessen darin liege, dass in diesen Fällen höhere Konzentrationen bestanden als sonst, und wir versuchten diese Störung teils durch Zusatz einer grösseren Menge Dichlorophenolindophenol zu beseitigen, teils dadurch, dass wir durch Verdünnen der Enzymlösung den fraglichen Faktor abschwächten. Die nachstehende Tabelle verzeichnet die Ergebnisse solcher Versuche.

TABELLE 4.

	Analysergebnis; $\gamma$ Bs		
	nach 1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.
Unverdünntes Enzym Farbe 50 $\gamma$ /ml	130	122	111
Enzym + M/15 Phosphat pH 7,3 = 1 + 1 Farbe 50 $\gamma$ /ml	117	119	
Enzym wie oben verdünnt; Farbe 200 $\gamma$ /ml	77	76	

Zusatz von 118,1 Bs in sämtlichen Röhrchen. Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Aktivität im Methylenblau-Versuch nach LEHMANN (1930) (siehe S. 32).

Unverdünntes Enzym: 8 Minuten  
 Verdünntes „ 13 „

(Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.)

Die Verdünnung der Enzymlösung hat in Verbindung mit einem Farbzusatz von 50  $\gamma$ /ml in diesem Falle also die gewünschte Wirkung.

*Jahreszeitliche Variationen:* In den Monaten September und Oktober 1940 erhielten wir indessen *in der Regel* auch bei Farbzusatz und nach Verdünnung des Enzyms in der oben beschriebenen Weise zu hohe Werte. Wir haben angenommen, dass die Konzentration des unbekanntes Faktors in diesen Fällen so gross ist, dass der Faktor durch Verdünnung und Farbzusatz nicht eliminiert werden kann. Das Enzym lässt sich nicht beliebig verdünnen. Sinkt die Aktivität des verdünnten Enzyms unter einen gewissen empirisch gefundenen Wert ab (siehe unten S. 421), so genügt die Reaktionsgeschwindigkeit nicht für die vollständige Dehydrierung von 118  $\gamma$  Bs innerhalb einer Stunde. Wir versuchten es mit Abänderungen von Einzelheiten der Enzymbereitung, um möglicherweise auf diesem Wege die Fehlerquelle auszuschalten, doch ohne Erfolg. Da wir im November 1940 wieder richtige Bs-Werte erhielten, ohne dass wir eine Änderung in der Darstellung des Enzyms vorgenommen hatten, haben wir die fragliche Erscheinung als eine „jahreszeitliche Variation“ aufgefasst, die ja in bezug auf Dehydrogenasenlösungen nichts Ungewöhnliches sind. SJÖSTRÖM, (1937) und MÄRTENSSON, (1940) geben an, die Citronensäurebestimmungsmethode nach Thunberg liefere im Frühjahr und besonders im April weniger zuverlässige Werte. AHLGREN, (1938) hat eine starke jahreszeitliche Variation der Wirkung seines „X-Faktors“ auf Succinodehydrogenaselösungen nachgewiesen.

Man kann diese Fehlerquelle beseitigen, indem man sich der spezifischen und starken Hemmung bedient, welche die Malonsäure auf die Succinodehydrogenase ausübt. Der unbekanntes Faktor wird durch Malonat nicht gehemmt. Bei der ursprünglichen Gestaltung der Bs-Bestimmungsmethode stellt man den Ceriverbrauch für Enzym + Analysenprobe und für Enzym + Wasser fest. Der Unterschied im Ceriverbrauch entspricht

der Bs-Menge der Probe. Hier bedienen wir uns statt dessen des Unterschieds im Ceriverbrauch zwischen Enzym + Analysenprobe und Enzym + Analysenprobe + Malonat. Das folgende Beispiel mag das Verfahren beleuchten; das sich nur unerblich von dem früher beschriebenen unterscheidet. Gleichzeitig wird die zufriedenstellende Genauigkeit bei dieser Modifikation der Technik veranschaulicht.

TABELLE 5.

Zugesetzte $\gamma$ Bs	Analyseergebnis $\gamma$ Bs	
	mit der »Malonat-Methode«	mit der ursprünglichen Methode
118,1	123	133
	124	139
	114	140
	112	135
59,0	64	75
	65	84
29,5	28	47

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Zu diesem Versuch sind 4 verschiedene Enzymlösungen verwendet worden.

Man kann dieses Verfahren entweder ständig gebrauchen, oder auch nur bei den Enzymlösungen, die es unbedingt erfordern. (Siehe unten S. 62 über die Verwendung verschiedener Modifikationen.) Aus dem Obigen geht hervor, dass man für jede Enzymlösung Kontrollanalysen einer bekannten zugesetzten Menge Bs ausführen muss. Ich habe dies regelmässig getan und ausserdem in der Regel solche Kontrollbestimmungen auch jeden Tag gemacht. So kann man versichert sein, dass das Enzym durch die Aufbewahrung nicht gelitten hat. Für diese Analysen habe ich Doppelbestimmungen von 1 ml 0,001-m. Succinat (= 118,1  $\gamma$  Bs) gemacht.

Die Darstellung der Enzymlösung ist der schwache Punkt dieser Methode zur Bs-Bestimmung. Um ein richtiges Enzym zu erhalten, ist es von grösster Bedeutung. Fleisch von guter Qualität zu verwenden (Fleisch von einem älteren Tier, ohne Sehnen und Fett). Infolge der ungewöhnlichen Verhältnisse war es in den letzten Monaten sehr schwierig, für die Enzymbereitung vollwertiges Pferdefleisch zu erhalten. Bei Bs-Bestimmung von 118,1  $\gamma$  Bs mit Enzymen aus schlechtem Fleisch liegen die erhaltenen Bs-Werte entweder 10—15 % zu niedrig

oder zu hoch. Die Differenz zwischen Doppelbestimmungen ist aber ebenso klein wie bei Bs-Bestimmung mit vollwertigem Enzym. Nachstehende Tabelle zeigt das typische Ergebnis einer Bs-Bestimmung mit einem Enzym aus schlechtem Fleisch.

Als Probe 0,001-m.	<i>Analysenergebnis: <math>\gamma</math> Bs</i>		
Succinatlösung.	130	132	(Enzym 14. 10. 40)
Zugesetzt 118,1 $\gamma$ Bs.	103	104	( „ 6. 2. 41)

Wenn man nicht vollwertiges Fleisch und somit vollwertige Enzyme erhalten kann, kann man auch Enzyme aus schlechtem Fleisch anwenden, zum Beispiel zur Feststellung einer Differenz zwischen der Bs-Menge in zwei Analysenproben. Man muss hierbei stets beachten, dass der erhaltene absolute Bs-Wert nicht richtig ist.

Eine weitere Standardisierung der Enzymdarstellung ist wünschenswert. Am zweckmässigsten wäre es, wenn man ein längere Zeit (einige Monate— $\frac{1}{2}$  Jahr) haltbares Enzympräparat erhalten könnte. Versuche mit Trockenpräparaten (WEIL-MALHERBE 1937) haben keine befriedigenden Ergebnisse gezeigt. Diese Enzympräparate hatten zu niedrige Aktivität. Die diesbezüglichen Versuche werden fortgesetzt.

*Enzymlösung:* Die Aktivität der Enzymlösung, gemessen im Methylenblau-Versuch nach J. LEHMANN (1930), soll nicht geringer sein, als es einer Entfärbungszeit von 14 Min. entspricht. Schwächere Enzyme vermögen in der festgesetzten Reaktionszeit nicht 118  $\gamma$  Bernsteinsäure vollständig zu dehydrieren, wie nachstehende Tabelle zeigt.

TABELLE 6.

<i>Enzymaktivität</i> Entfärbungszeit in Minuten	<i>Analysenergebnis: <math>\gamma</math> Bs</i>		
	nach $\frac{1}{2}$ Stde.	nach 1 Stde.	nach 2 Stdn.
6	115	115	114
12	—	120	122
13	—	117	119
14 $\frac{1}{2}$	107	112	120
17	96	110	116

Sämtliche Proben sind mit 118,1  $\gamma$  Bs versetzt. Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen.

Die „Spontanreduktion“, d. h. die Entfärbungszeit im Methylenblau-Versuch nach Zusatz von 15  $\gamma$  Methylenblau und ohne Zusatz eines Sub-

strates (siehe LEHMANN 1929 und 1930), ist in der Regel zugleich mit der Aktivität untersucht worden. Hierdurch wird kontrolliert, dass das Enzym nur wenig „Spontanwasserstoffdonatoren (Spontandonatoren)“ enthält. Niedriger Gehalt an Spontandonatoren (= lange Entfärbungsdauer im Spontanreduktionsversuch) ist ein Zeichen dafür, dass die Muskulatur vor der Enzymextraktion genügend gewaschen worden ist. (Beim Waschen werden sowohl die Spontandonatoren als die wasserlöslichen Coenzyme entfernt.) LEHMANN hat für Methylenblau-Versuche nur Enzyme benutzt, deren „Spontanentfärbungszeit“ über 60 Minuten ist. Auch bei der Bs-Bestimmungsmethode ist diese Regel befolgt worden.

Die Enzymlösungen werden mit der Zeit von Mikroorganismen angegriffen, selbst bei einer Temperatur im Aufbewahrungsraum von  $+4^{\circ}$ . Ein Zeichen beginnender Zersetzung ist die Verkürzung der Spontanentfärbungszeit des Enzyms. Nach meiner Erfahrung gibt eine starke Verkürzung dieser Entfärbungszeit von einem Tage zum andern an, dass das Enzym unbrauchbar ist, selbst wenn die Zeit nicht unter 60 Minuten abgesunken ist. Ich verwende kein Enzym, dessen Spontanentfärbungszeit während der Aufbewahrung (beispielsweise von 4 Stunden auf  $1\frac{1}{2}$  Stunde) stark abgesunken ist. Wir berücksichtigen also mehr die *Veränderung der Spontanreduktion* während der Aufbewahrung des Enzyms, als die absolute Entfärbungszeit.

Ausserdem liefert die Farbe der Enzymlösung einen gewissen Anhalt für die Beurteilung dessen, ob das Enzym nach einiger Aufbewahrung brauchbar ist oder nicht. Frische Enzymlösungen haben eine graurote Farbe. Bei beginnender Zersetzung verschwindet der rote Ton und die Lösung ist rein blassgrau.

*Der pH des Reaktionsgemisches:* Die Analyse der Succinatlösung bei verschiedenem pH und 118,1  $\gamma$  Bernsteinsäurezusatz geht aus folgender Tabelle hervor:

TABELLE 7.

pH des Reaktionsgemisches	Analyseergebnis: $\gamma$ Bs	
	nach $\frac{1}{2}$ Stde.	nach 1 Stde.
6,47	101	117
7,38	113	115
7,73	119	120

(Die angegebenen Bs-Werte sind das Mittel aus zwei Bestimmungen.)

Der pH wird elektrometrisch mit der Chinhydronelektrode in einer dem Reaktionsgemisch entsprechenden Lösung gemessen, doch ohne Ferricyanid.

Wie sich ergibt, verlangsamt sich die Reaktion bei Verschiebung des pH nach der sauern Seite, doch nicht mehr, als dass der 1-Stdn.-Wert richtig ist.

Die Reaktion ist also von dem pH des Reaktionsgemisches ziemlich unabhängig, doch setzen wir der Sicherheit halber einen Phosphatpuffer mit dem pH 7,38 zu. Dieser pH dürfte möglicherweise etwas vorteilhafter sein, als eine mehr alkalische Reaktion (siehe hierüber LEHMANN, 1930).

*Reaktionszeit:* Die Dehydrierung der Bernsteinsäure erfordert natürlich eine gewisse Zeit. In der Regel geben die Enzyme, die im Methylenblau-Versuch die stärkste Aktivität zeigen, bei den Analysen die schnellste Dehydrierung. Wie oben erwähnt, soll man keine Enzyme verwenden, die in der Aktivitätsprüfung eine Entfärbungszeit von mehr als 14 Min. haben. Arbeitet man dagegen mit Enzymlösungen von dieser oder höherer Aktivität, so sind 118  $\gamma$  Bernsteinsäure schon nach 30 Min. vollständig oxydiert. Der Sicherheit halber haben wir als generelle

TABELLE 8.

Zugesetzt $\gamma$ Bs	Analysergebnis: $\gamma$ Bs			
	nach $\frac{1}{2}$ Stde.	nach 1 Stde.	nach $1\frac{1}{2}$ Stde.	nach 2 Stdn.
236,1	218	228		229
118,1	94	122	124	
		125	123	123
	99	119		123
	115	115		114
		120		122
	112	113		116
		124		124
	117		119	
59,0	52	59	60	60
29,5	26	30		
	27	27		29
	30	32		
	33			35
14,8	16	17	16	18
7,4	9	8	8	

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.



Reaktionszeit 60 Min. gewählt, nach welcher Zeit auch die Umsetzung von 236  $\gamma$  in der Regel abgeschlossen ist. Bei Bestimmung grösserer Bernsteinsäuremengen spielen andere Faktoren mit, auf die ich weiter unten zurückkomme.

Aus der Tabelle 8. geht hervor, dass die Ausbeute auch konstant ist, nachdem das richtige Niveau erreicht ist.

*Bestimmung grösserer Bs-Mengen* (obere Kapazitätsgrenze der Methode): Die zugesetzte Menge Ferricyanid genügt, um mit etwa 500  $\gamma$  Bs zu reagieren. Theoretisch könnte die Methode also zur Bestimmung von Mengen zwischen etwa 5 und 500  $\gamma$  brauchbar sein. Es hat sich indessen gezeigt, dass man bei grösseren Succinatmengen, z. B. 470  $\gamma$ , eine Ausbeute erhält, die 10—15 % unter dem berechneten Wert, d. h. der zugesetzten Bs-Menge, bleibt.

Bei einzelnen Enzymen kann man dieselbe Erscheinung, obwohl weniger auffällig, auch bei Bestimmung von 236  $\gamma$  Bs beobachten, doch haben wir sie nie bei Bestimmung kleinerer Bs-Mengen, 118  $\gamma$  oder weniger, gesehen. Die Ursache dieser Verluste könnte in nicht genügend langer Reaktionszeit zu suchen sein. Oder die in diesen Fällen gebildete relativ grosse Fumaratmenge kann durch Adsorption an das Enzym allmählich den grösseren Teil der Enzymfläche „blockieren“ und so den letzten Abschnitt der Bs-Dehydrierung verhindern oder verlangsamen. Das Analyseergebnis ändert sich nicht, mag man nun die Enzymmenge oder die Reaktionszeit verdoppeln. Die Ergebnisse sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

TABELLE 9.

Zugesetzt $\gamma$ Bs	Analyseergebnis: $\gamma$ Bs				nach 1 Stde. mit 1,0 ml En- zymlösung
	nach 1 Stde.	nach 2 Stdn.	nach 3 Stdn.	nach 4 Stdn.	
236,1	203	213	216	213	
472,2	425	425			412

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen. Aktivität der Enzymlösung 5  $\frac{1}{2}$  bzw. 7  $\frac{1}{2}$  Minuten.

Gegenwärtig kann ich dieses Phänomen nicht erklären, doch werde ich ihm weitere Untersuchungen widmen. Die praktische Folge diesbezüglich dürfte sein, dass man sichere Bestimmungsergebnisse also nur für Werte um 200  $\gamma$  und darunter erhält. Bei höheren Succinatmengen kann man entweder den gefundenen Wert als ungefähren Wert und um 10—15 % zu

niedrig betrachten, oder wenn die Materialmenge es gestattet, kann man eine neue Analyse an einer verdünnten Probe ausführen.

*Licht:* Da Licht die spontane Oxydation von Ferrocyanid zu Ferricyanid beschleunigt, dürfen die Zentrifugier- und Titrierrohren nicht längere Zeit scharfem Tageslicht ausgesetzt sein (siehe LEHMANN 1938).

*Trichloressigsäurekonzentration:* Wenn die Reaktion abgebrochen werden soll, fällt man das Eiweiss mit Trichloressigsäure, wodurch die Konzentration des letzteren Stoffes im Reaktionsgemisch 5 % beträgt. Unvollständige Eiweissfällung kann Unregelmässigkeiten der Ergebnisse veranlassen, nämlich dadurch, dass reduzierende Substanzen die Ceritrierung stören. Dass die benutzte Trichloressigsäuremenge ausreicht, geht daraus hervor, dass man bei 5 % bzw. 10 % Trichloressigsäure im Reaktionsgemisch dasselbe Ergebnis erhält.

5,9 %	Trichloressigsäure:	zugesezte Bs	118,1 $\gamma$
		Ausbeute	120 $\gamma$
10 %	„	zugesezte Bs	118,1 $\gamma$
		Ausbeute	120 $\gamma$

*Aufbewahrung der Proben nach Abbruch der Reaktion:* Neben Stoffen, die durch das Ferricyanid schnell oxydiert werden (z. B. Succinat in Gegenwart von Succinodehydrogenase), enthält das Reaktionsgemisch auch Stoffe, die sehr langsam oxydiert werden. Verwahrt man eine Probe *nach* der Eiweissfällung mit Trichloressigsäure, so steigt deshalb der Ceriverbrauch langsam an. Dieser Anstieg ist stärker, wenn die Probe zusammen mit dem Eiweissniederschlag verwahrt wird, als wenn man sie ohne diesen (abpipettiert) aufbewahrt. Siehe die nachstehende Tabelle.

TABELLE 10.

*Aufbewahrung der Proben nach Abbruch der Reaktion.*

	Aufbewahrung abpipettiert, ohne Eiweissfällung			Aufbewahrung mit der Eiweissfällung		
	$1/2$ Stde.	$1 1/2$ Stde.	$2 1/2$ Stdn.	$1 1/2$ Stde.	$2 1/2$ Stdn.	20 Stdn.
ml Ceriverbrauch der Enzym-Was- serkontrolle .....	0,616	0,593	0,628	0,626 0,628 0,844	0,687	0,757 1,029

Dies hat zur Folge, dass man, wenn die Proben längere Zeit (mehrere Stunden bis einen Tag) nach der Eiweissfällung aufbewahrt werden, auch die Enzym-Wasser-Kontrolle ebenso lange aufbewahren muss. (Wird diese sofort, die Analysenprobe hingegen erst beispielweise nach 24 Stunden titriert, so ergeben sich folglich zu hohe Bs-Werte.) Dass man auch richtige Bs-Werte bei Aufbewahrung der Proben bis 24 Stunden nach der Eiweissfällung erhält, zeigt die Tabelle 12, S. 48. Die Analysen von 14,8  $\gamma$  Bs sind sämtlich erst 24 Stunden nach dem Zusetzen der Trichloressigsäure titriert worden.

*Die Schwefelsäurekonzentration beim Titrieren:* Bei der Arbeit an seiner Milchsäurebestimmungsmethode (LEHMANN, 1938) hat LEHMANN<sup>1</sup> einige Beobachtungen betreffend die Ceritrierung gemacht, die auch bei der Bestimmung von Bs beachtet werden müssen. Das Titrierverfahren ist ja in beiden Methoden das gleiche. Die Probe erfährt während des Trierens eine gewisse Verdünnung infolge des Ceriverbrauchs. Da die Probelösung durch den Schwefelsäurezusatz (über das Titrierverfahren siehe S. 32) saurer ist, als die Cerisulfatlösung, die für die Titration benutzt wird, verringert sich hierdurch die Acidität der Probe successiv. *Bei starker Abnahme der Acidität steigt der Ceriverbrauch.* Deshalb muss ein gewisser Überschuss von 18-n. Schwefelsäure zugesetzt werden. Bei einem Ceriverbrauch von etwa 2 ml darf die zugesetzte Menge 18-n. Schwefelsäure 3 ml nicht unterschreiten, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

TABELLE 11.

ml 18—n $H_2SO_4$ zugesetzt	ml Cerisulfatlösung ver- braucht bei der Titrierung
1	2,042
2	1,954
3	1,874
5	1,875
6	1,874

Als „Probe“ 2 ml Mohrsche Gebrauchslösung wie bei Titerstellung der Cerisulfatlösung. Totalvolumen vor der Titrierung 8 ml, nachher ungefähr 10 ml. (Bei dieser Titrierung wurde Setoglucin 0 als Indikator verwendet.)

<sup>1</sup> Persönliche Mitteilung.

Die Temperatur beim Titrieren: Wenn den abpipettierten Probelösungen Wasser und 18-n. Schwefelsäure zugesetzt wird, entwickelt sich infolge der Verdünnung der Schwefelsäure Wärme. Bei ansteigender Temperatur während der Titration verringert sich der Ceriverbrauch, weshalb auf die Temperatur der Lösung Rücksicht genommen werden muss. Das Wasser und die Schwefelsäure müssen deshalb so rechtzeitig vor dem Titrieren zugesetzt werden, dass die Proben inzwischen Zimmertemperatur haben annehmen können (LEHMANN<sup>1</sup>).

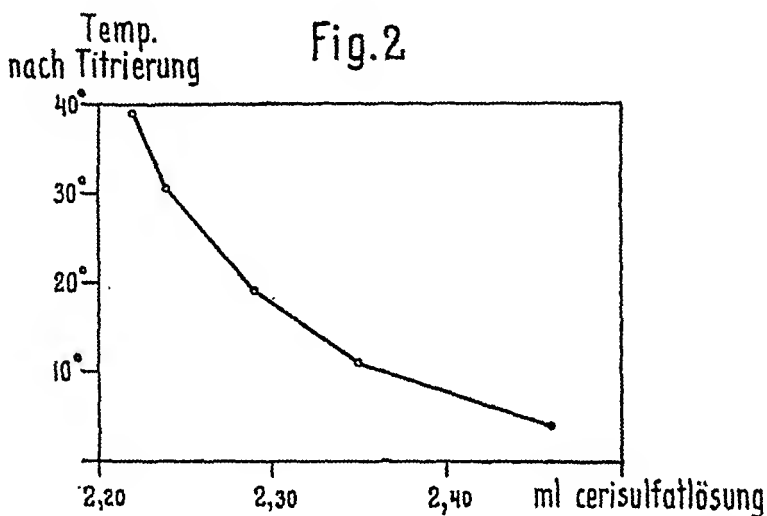


Fig. 2. Ceriverbrauch bei der Titrierung von 2 ml 0,001 mol. Mohrs Lösung bei verschiedenen Temperaturen. Die Temperatur wurde unmittelbar nach der Titrierung gemessen. Indikator Setoglaucin O.

### Die Genauigkeit der Bs-Bestimmung.

Die verschiedenen Faktoren, die auf die Methode von Einfluss sind, haben wir oben untersucht und die für die Bs-Bestimmung optimalen Verhältnisse festgestellt. Die Technik ist also vorläufig endgültig, und wir können dazu übergehen, durch Analyse bekannter Bs-Mengen die Genauigkeit der Methode zu ermitteln.

Folgende Bs-Bestimmungen von Succinatlösungen sind mit grösster Sorgfalt ausgeführt. Besonders wichtig ist es, beim Umschlag bis zur exakt gleichen Farbstärke zu titrieren.

<sup>1</sup> Persönliche Mitteilung.

TABELLE 12.

Zugesetzte $\gamma$ Bs:	236,1	118,1	14,8
Analysergebnis: ( $\gamma$ Bs)	236,7	117,3	16,7
	234,8	119,0	16,1
	233,9	118,5	16,1
	235,2	117,5	14,0
	236,5	116,3	15,4
	236,1	118,3	16,7
	238,9	118,9	16,5
	236,5	118,4	16,5
	237,5	119,1	16,0
	234,6	118,6	15,1
Mittl. Werte:	236,1	118,2	15,9
Mittl. Fehler:	1,5	0,9	0,9

Als Probelösung wurde 1 ml 0,002-m., 0,001-m., bzw. 0,00125-m. Succinat-lösung verwendet. Der hierbei verwendete Enzym-Wasser-Wert ist Mittelwert aus 4 Enzym-Wasser-Kontrollen. Der mittlere Fehler dieses Mittelwertes wurde berechnet;  $\Sigma_M = \pm 0,68 \gamma$  Bs.

Der mittlere Fehler einer Doppelbestimmung:  $\frac{\sigma}{\sqrt{2}} = \pm 11,7$  Bs

Der Fehler bei Bestimmung des Enzym-Wasser-Wertes muss aber auch beachtet werden. Der ganze mittlere Fehler einer Doppelbestimmung ist somit:

$$\sqrt{\frac{1,5^2}{2} + 0,7^2} = \pm 1,3 \gamma \text{ Bs.}$$

Bei diesen kurzen Versuchsreihen entspricht der gefundene Wert  $\pm 3 \sigma$  nicht immer den theoretischen. In diesem Falle ( $n-1 = 9$  bzw.  $n-1 = 3$ ) muss man statt dessen mit  $\pm 3,8 \sigma$  rechnen.

$$\pm 3,8 \sigma = \pm 4,9 \gamma \text{ Bs.}$$

Der mittlere Fehler bei Bestimmung von Bs in Serum und Plasma ist aus 138 Doppelbestimmungen berechnet. Es wurden stets 2 Bestimmungen des Enzym-Serum-Wertes und 2 Bestimmungen des Enzym-Serum-Malonat-Wertes ausgeführt. Die mittleren Fehler der Differenz zwischen den beiden Bestimmungen im ersten und zweiten Falle wurden berechnet ( $\sigma_B$ , bzw.  $\sigma_{M_S}$ )

$$\sigma_{B_S} = \pm 5,0 \gamma \text{ Bs.}$$

$$\sigma_{M_S} = \pm 4,5 \gamma \text{ Bs.}$$

Der mittlere Fehler einer Doppelbestimmung ist somit:

$$\frac{\sigma_{Bs}}{\sqrt{2}} = \pm 3,5 \gamma \text{ Bs.} \qquad \frac{\sigma_{Ms}}{\sqrt{2}} = \pm 3,2 \gamma \text{ Bs.}$$

Dann wurde der ganze mittlere Fehler einer Bs-Bestimmung, mit Doppelbestimmungen von Enzym-Serum-Wert und Enzym-Serum-Malonat-Wert, berechnet.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sigma_{Bs}^2}{2} + \frac{\sigma_{Ms}^2}{2}} = \pm 4,7 \gamma \text{ Bs.}$$

Da in der folgenden Untersuchung die Differenz zwischen der Bs-Konzentration in zwei verschiedenen Serumproben von Interesse sein kann, wird auch der mittlere Fehler dieser Differenz berechnet ( $\sigma_{\text{Dif}}$ ).

$$\sigma_{\text{Dif}} = \pm 6,7 \gamma \text{ Bs.}$$

### Spezifität.

Für eine Reihe von Substanzen ist ermittelt worden, ob sie durch die Enzymlösung dehydriert werden. Gleichzeitig ist untersucht worden, ob sie die Bestimmung einer zugesetzten bekannten Bs-Menge stören. Bei diesen letzteren Versuchen betrug das Verhältnis zwischen dem untersuchten Stoff und der Bs-Menge gewöhnlich 10 : 1 und 100 : 1.

In der Regel wurden folgende Reaktionsgemische verwendet:

0,02-mol. X-Substanz	..... 0,5 ml	0,1 ml	0,5 ml	0,5 ml
0,002-mol. Succinat	..... —	—	0,5	—
0,0002-mol. „	..... —	—	—	0,5
Aqua redest.	..... 0,5	0,9	—	—

Ausserdem wurden sämtliche Proben mit 1,0 ml Ferricyanid-Farbstoff Puffer-Lösung und 0,5 ml Enzym versetzt. Die Bestimmungen sind in der auf S. 32 angegebenen Weise ausgeführt worden. Im Reaktionsgemisch ist also die Konzentration der untersuchten Substanz 0,004-molar bzw. 0,0008-molar.

Bei der Untersuchung des etwaigen hemmenden Einflusses eines Stoffes auf die Succinodehydrogenase empfiehlt es sich, eine möglichst grosse Menge Bs in Gegenwart des fraglichen Stoffes zu bestimmen. Dabei werden auch sehr leichte Hemmungswirkungen erkannt, was bei der Dehydrierung kleinerer Bs-Mengen nicht der Fall gewesen wäre. Im letzteren Falle kann ein Überschuss an Enzym eine leichte Hemmungswirkung überdecken, so dass die zugesetzte Bs-Menge trotz der Hemmung in der verwendeten Reaktionszeit vollständig umgesetzt wird. Wir haben bei diesen Versuchen in der Regel mit einem Zusatz von 236  $\gamma$  Bs bei Enzymen mit hoher Aktivität (weniger als 5 Min. Entfärbungszeit in der

Aktivitätsprobe) gearbeitet. Bei weniger aktiven Enzymlösungen haben wir uns der Bs-Konzentration des oben angegebenen Versuchs, 118  $\gamma$ , bedient.

Wird ein Stoff durch die Enzymlösung dehydriert, so geschieht dies entweder mit Hilfe der Succinodehydrogenase oder einer anderen in der Lösung vorhandenen Dehydrogenase. Welches die wirksame Dehydrogenase ist, entscheidet ein Versuch mit dem fraglichen Stoff und einer grösseren (siehe oben) Bs-Menge in derselben Probe. Wird die Substanz mit Hilfe der Succinodehydrogenase oxydiert und somit an diese adsorbiert, so wird infolge der langsameren Umsetzung dieses Enzym daran gehindert, innerhalb der Reaktionszeit auch die zugesetzte Succinatmenge zu oxydieren („das Enzym wird für Bs blockiert“). Wird dagegen der fragliche Stoff mit Hilfe einer anderen Dehydrogenase dehydriert, so bleibt die Succinatumsatzung unbeeinflusst. Es ergibt sich in diesem Falle eine Addition der Dehydrierung beider Stoffe, die im Endergebnis der Bestimmung abgelesen wird. (Dies unter der Voraussetzung, dass ein Überschuss an Wasserstoffacceptor, Ferricyanid, vorhanden ist.)

*Untersuchte Substanzen:* Folgende Gruppen von Stoffen sind hier von Interesse.

1. Substrate der übrigen in der Enzymlösung vorkommenden Dehydrogenasen
  - a) für Enzyme, die kein Coenzym benötigen,
  - b) für Enzyme, die Codehydrogenase I (Cozymase) benötigen,
  - c) für Enzyme, die Codehydrogenase II benötigen,
 (b) und c) bedeutet gleichzeitig Kontrolle darüber, dass die Enzymlösung durch das Waschen von Coenzym befreit ist).
- 2) Stoffe, die der Bs chemisch nahe stehen.
- 3) Stoffe, die im Organismus Bs bilden oder von Bs gebildet werden können.
- 4) Enzymgifte, die experimentell von Interesse sind.
- 5) Stoffe, die normal oder unter gewöhnlichen experimentellen Verhältnissen in Serum, Harn, Gewebsflüssigkeit o. dgl. vorkommen können und von diesem Gesichtspunkt aus von Interesse sind.

Nachstehend sind sämtliche untersuchten Substanzen verzeichnet. Diejenigen, die die Bs-Dehydrierung hemmen, sind mit einem — versehen, einerlei, ob sie selbst dehydriert werden oder nicht. Stoffe, die oxydiert werden, ohne die Succinatumsatzung zu beeinflussen, sind mit einem + bezeichnet. Die übrigen sind indifferent.

Säuren und Basen sind als Salze in neutraler Lösung verwendet worden, die Säuren in der Regel als Natriumsalz, die Basen in der Regel als Chloride.

— Aeonitsäure	B. D. H.
(—) Äthylbernsteinsäure	Kahlbaum
Äthyläther	Aqua redest., mit Äther ad narcosin gesättigt
β-Alanin	Fraenkel u. Landau
(+) l-Apfelsäure	Merek
Arginin	Argininnitrat Hoffmann la Roche
Asparaginsäure	Kahlbaum
Brenztraubensäure	Natriumpyruvat <sup>1</sup>
n-Buttersäure	Kahlbaum
Citronensäure	Natriumcitrat Merck
Essigsäure	Natriumacetat Merck pro analysi
— Fumarsäure	Merck
Fruktose	Merck puriss. cryst.
Galaktose	Kahlbaum
d-Glutaminsäure	Hoffmann la Roche
Glutarsäure	Kahlbaum
α-Glycerinphosphorsäure	Natriumglycerinphosphat Merck
Glykose	Merck
Harnstoff	Kahlbaum
— Hexosediphosphorsäure	Calciumhexosediphosphat <sup>1</sup> , eine Mischung, bestehend aus den Gly- kose-, Fruktose- und Mannose- Derivaten.
Hexosemonophosphorsäure	Calciumhexosemonophosphat <sup>1</sup> , aus den Glykose-, Fruktose- und Man- nose-Derivaten bestehend.
Histidin	Hoffmann la Roche
Isoleucin	Kahlbaum
— α-Ketoglutarsäure	Synthetisiert nach NEUBERG u. RINGER (1915).
Lävulinsäure	Hässle. Schmelzpunkt 35°
Maleinsäure	Kahlbaum
— Malonsäure	Merek
— Methylbernsteinsäure	Kahlbaum
d-Milchsäure	d-Litiumlaktat <sup>1</sup>
— Oxallessigsäure	Synthetisiert nach Fenton u. Jones (1900).
— Oxalsäure	Kaliumacetat Kahlbaum pro analysi
+ l-α-Oxiglutarsäure	Das Natriumsalz, aus dem Zinksalz dargestellt <sup>2</sup> .
Phenylalanin	Hoffmann la Roche

<sup>1</sup> Dieses Präparat hat mir Professor J. LEHMANN zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm sehr danke.

<sup>2</sup> Dieses Präparat hat mir Professor T. THUNBERG zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm sehr dankbar bin.



Phenolphtalein	Kahlbaum. 3 Tropfen 1 ‰ Lösung in Alkohol pro ml Aqua redest.
Propionsäure	Kahlbaum
— Pyrophosphorsäure	Natriumpyrophosphat Kahlbaum
dl-Serin	Hoffman la Roche
+ Tartronsäure	B. D. H.
Urethan	Merck
n-Valeriansäure	Kahlbaum
Weinsäure	Kalium-Natrium-Tartrat Kahlbaum pro analysi

Die Wirkung der Stoffe, die auf die Bs-Bestimmung von Einfluss waren, wurde näher untersucht; die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

TABELLE 13.

Substanz	Substanz allein $\mu$ Mol.		10 $\mu$ Mol. Sub- stanz + $\gamma$ Bs			Differenz in $\gamma$ Bs zwischen 10 $\mu$ Mol. Substanz und	
	2	10	11,8	118,1	236,1	118,1 $\gamma$	236,1 $\gamma$ Bs
Aconitsäure .....	0	0	—	39	—	— 79	—
Apfelsäure .....	3	5	18	—	—	—	—
	1	0	—	—	—	—	—
Äthylbernstein- säure .....	—	9	—	124	241	—	— 4
	—	2	—	—	211	—	— 27
Fumarsäure .....	3	4	18	116	—	— 6	—
	—	2	—	89	—	— 31	—
Hexosediphosphor- säure .....	98 <sup>1</sup>	—	—	201 <sup>1</sup>	—	— 15 <sup>1</sup>	—
	96 <sup>1</sup>	—	—	184 <sup>1</sup>	—	— 30 <sup>1</sup>	—
$\alpha$ -Ketoglutarsäure	32	49	57	—	140	—	— 145
Malonsäure .....	—	0	—	3	—	— 115	—
Methylbernstein- säure .....	8	7	—	128	226	+ 3	— 17
Oxalessigsäure ...	6 <sup>2</sup>	—	—	—	3 <sup>2</sup>	—	— 239 <sup>2</sup>
Oxalsäure .....	—	2	—	83	—	— 37	—
1- $\alpha$ -Oxiglutarsäure	9	15	—	134	—	+ 1	—
Pyrophosphor- säure .....	—	—	—	5	—	— 113	—
Tartronsäure .....	—	10	—	—	245	—	— 1

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass nur ein Stoff, nämlich Hexosediphosphat, in etwa demselben Umfang wie Bs de-

<sup>1</sup> 0,5 Mol.<sup>2</sup> 2,5 Mol.

hydriert wird.  $\alpha$ -Ketoglutarsäure wird langsam oxydiert, l- $\alpha$ -Oxiglutarsäure unbedeutend, während einige weitere Substanzen eine minimale oder unsichere Wirkung ausüben.

Oxallessigsäure, Malonsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Pyrophosphorsäure *hemmen* die Succinodehydrogenase stark, Aconitsäure nicht ganz so stark. Fumarsäure und Oxalsäure wirken schwach, Methyl- und Äthylbernsteinsäure nur ganz geringfügig hemmend.

Diese Ergebnisse haben gewisse Konsequenzen für die Methodik der Bs-Bestimmung. Sie unterrichten uns aber auch über die Spezifität der Succinodehydrogenase, was von theoretischem Interesse sein kann. Dies wird in einer späteren Arbeit erörtert.

### Methodische Probleme aus Anlass der obigen Befunde.

Die oben aufgezählten Stoffe können in gewissen Konzentrationen die Bs-Bestimmung nach der hier gestalteten Technik stören. *Methyl- und Äthylbernsteinsäure* sind, soweit bisher bekannt, ohne biologisches Interesse. Ihre Wirkung auf die Bs-Bestimmung ist ausserdem äusserst gering. Die hemmende Wirkung der *Oxalsäure* und der *Aconitsäure* ist wahrscheinlich zu schwach, um eine Rolle spielen zu können, ausser in sehr hohen, für die Oxalsäure unphysiologischen Konzentrationen. Über das Vorkommen der Aconitsäure unter normalen und pathologischen Verhältnissen ist sehr wenig bekannt. Die normale Konzentration der *Oxallessigsäure* in Blut und Geweben ist sehr niedrig (SZENT-GYÖRGYI 1937 b). Zudem wird sie schon bei neutraler Reaktion schnell in die für die Bs-Bestimmung unschädliche Brenztraubensäure umgewandelt. Diese Umwandlung dürfte schon nach wenigen Stunden annähernd vollständig sein. Mindestens diese Zeit verfliesst aber gewöhnlich zwischen der Entnahme der Probe und der Ausführung der Analyse.

$\alpha$ -Ketoglutarsäure und Hexosediphosphorsäure beeinflussen die Bs-Bestimmung in sehr hohem Grade. Diese beiden Stoffe können in biologischem Material (Blut, Gewebsflüssigkeit u. dgl.) vorkommen, weshalb es eine Methode zu finden gilt, womit man sie vor Beginn der Bs-Bestimmung entfernen kann.

*Methode zur Bestimmung von Bs in Gegenwart von Hexosediphosphorsäure* (Technik 2): Diese Methode stützt sich auf die Tatsache, dass Malonsäure in passender Konzentration die Dehydrierung von Bs annähernd hundertprozentig hemmt, ohne

die Oxydierung von Hexosediphosphat zu beeinflussen. Siehe Tabelle 14.

TABELLE 14.

Rohr-Nr.	1	2	3	4	5	6
Aqua redestillata .....	—	0,5	—	0,1	—	—
Succinat 0,002-mol. ....	0,5	—	—	—	—	—
Hexosediphosphat 0,001-mol.	—	0,5	0,5	—	—	—
Malonat 0,10-mol. ....	—	—	—	—	0,1	—
» 0,02-mol. ....	0,5	—	0,5	—	—	—
Kaninchenserum mit Hexosediphosphat 0,0005-mol. ....	—	—	—	0,9	0,9	—
Kaninchenserum, mit 118,1 $\gamma$ Bs pro ml und 0,01-mol. Malonat .....	—	—	—	—	—	1,0
Zugesetzt $\gamma$ Bs. ....	118,1	—	—	—	—	118,1
Analysenergebnis, als $\gamma$ Bs berechnet .....	1	102	105	74	69	0

Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, wird die Dehydrierung von Hexosediphosphat weder in rein wässriger Lösung noch in Serum durch die hier angewandten Malonatkonzentrationen beeinflusst. Vergleichsweise sei erwähnt, dass 0,001-molares Malonat im Reaktionsgemisch die Succinodehydrogenase unter denselben Versuchsbedingungen annähernd hundertprozentig hemmt.

Bei der ursprünglichen Technik erhält man den Unterschied im Ceriverbrauch zwischen der Enzym-Probeflösung und der Enzym-Wasserlösung als Mass der Bs-Menge in der Analysenprobe. Hier verwenden wir statt dessen den Unterschied zwischen der Enzym-Probeflösung und der Enzym-Probef-Malonatlösung. Da die Malonathemmung bisweilen nicht vollständig, sondern nur 96—97 %-ig ist, können die mit dieser Technik erhaltenen Bs-Werte um 3—4 % zu niedrig sein. Über Ausführung, Lösungen usw. siehe S. 64.

*Methode zur Bestimmung von Bs in Anwesenheit von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure:* In den bisherigen Methoden zur Isolierung (und Bestimmung) von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure hat man gewöhnlich die Reaktion der Ketogruppe mit irgendeinem Ketonreagens verwendet. Die dabei gebildete Verbindung wurde durch Ausfällung oder Extraktion von der Bs geschieden (KREBS u. JOHNSON

1937 a, WEIL-MALHERBE 1937 a, KREBS 1938, KRUSIUS 1938 und 1940, SIMOLA 1939).

Um die  $\alpha$ -Ketoglutar säure zu bestimmen, hat man diese dann mit Permanganat oxydiert. Sie wird dabei quantitativ in Bs umgewandelt und lässt sich als solche bestimmen. KREBS (1940 b) hat eine vereinfachte Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Bs und  $\alpha$ -Ketoglutar säure ausgearbeitet. Dabei wird mit einer enzymatischen Methode (KREBS 1938) teils die Bs direkt, teils die „totale Bs“ nach Oxydation mit  $\text{KMnO}_4$  bestimmt. Im letzteren Falle wird Bs +  $\alpha$ -Ketoglutar säure bestimmt. Die letztere übt jedoch eine starke Hemmung auf die Succinodehydrogenase aus (siehe S. 28). In Gegenwart von  $\alpha$ -Ketoglutar säure werden bei dieser enzymatischen Bestimmungsmethode die Bs-Werte zu niedrig und die  $\alpha$ -Ketoglutar säurewerte zu hoch, was KREBS in seinen Versuchen nicht beachtet hat.

Diese Methoden zur Isolierung und Bestimmung von  $\alpha$ -Ketoglutar säure sind für verhältnismässig grosse Mengen Analysenmaterial und in der Regel für höhere Konzentrationen (Harn) ausgearbeitet worden als die, mit denen wir es hier zu tun haben. Es muss also eine Methode zur Beseitigung der  $\alpha$ -Ketoglutar säure vor der Bs-Bestimmung für kleine Mengen Analysenmaterial und niedrige Konzentrationen ausgearbeitet werden. (Die normale Konzentration der  $\alpha$ -Ketoglutar säure im Menschenserum ist nach KREBS (1938) 7,5—10,5  $\gamma$ /ml.)

Es ist nicht wahrscheinlich, dass man die  $\alpha$ -Ketoglutar säure bei diesen niedrigen Konzentrationen als ein schwerlösliches Salz ausfällen könnte. Auch die schwerlöslichen Succinate sind hierfür nicht brauchbar (siehe S. 12). Bleibt also der schon früher eingeschlagene Weg: man lässt die  $\alpha$ -Ketoglutar säure mit einem geeigneten Ketonreagens reagieren, worauf die gebildete Verbindung irgendwie von Bs isoliert wird. Es ist nicht anzunehmen, dass man dabei eine solche Verbindung quantitativ ausfällen kann. Vorversuche mit  $\alpha$ -Ketoglutaratlösungen und 2:4-Dinitrophenylhydrazin haben auch gezeigt, dass dies für diesen Fall nicht möglich war.

Es bleibt dann die Möglichkeit, die beiden Verbindungen durch Extraktion zu scheiden. Man kann die Bs extrahieren, während das Ketosäurederivat in der Lösung verbleibt. WEIL-MALHERBE (1937 a) extrahiert Bs mit Äther, in welchem die Verbindung der  $\alpha$ -Ketoglutar säure mit Bisulfit schwerlöslich ist. Es wurde versucht, diese Methodik für die Bestimmung kleiner Bs-Mengen abzuändern, wobei die Bs-Extraktion mit dem Schaukelverfahren nach WIDMARK vorgenommen wurde. Schweflige Säure ist indessen in Äther allzu leicht löslich, und diese Methodik ist deshalb hier nicht brauchbar.

Man kann das Keton-Derivat extrahieren, während die Bs in der Lösung verbleibt. In den bisherigen Methoden hat man das 2:4-Dinitrophenylhydrazon der  $\alpha$ -Ketoglutar säure mit Äthyläther oder Äthylacetat extrahiert (KREBS 1938, KRUSIUS 1938 und 1940, SIMOLA 1939). Bs ist indessen in Äthyläther nicht besonders schwerlöslich. Der Verteilungskoeffizient

der Bs zwischen Wasser und Äther ist etwa 5 bei 20°. Deshalb muss die Menge des Äthers bei der Extraktion im Verhältnis zur wässrigen Lösung klein sein, damit nicht zu viel Bs extrahiert wird. Dasselbe gilt für das Äthylacetat. Bei zweimaliger Extraktion mit  $\frac{1}{5}$  Volum Äther (KREBS 1938) werden, wenn man mit diesem Verteilungskoeffizienten rechnet, etwa 8 % Bs extrahiert, bei dreimaliger Extraktion mit derselben Menge (KRUSIUS 1940) etwa 11 %. Es wäre also von einem gewissen Vorteil, wenn man ein anderes Extraktionsmittel für das 2:4-Dinitrophenylhydrazon finden könnte, das Bs weniger leicht löst.

Bs ist schwerlöslich in Amyläther, Chloroform und Toluol (ÖRSKOV 1931). In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das 2:4-Dinitrophenylhydrazon der  $\alpha$ -Ketoglutar säure in Kohlentetrachlorid, Benzol, Toluol und Chlorbenzol praktisch *unlöslich* ist, in Amyläther, Isoamyläther und Chloroform *fast unlöslich*, in Amylalkohol, Essigsäureanhydrid *etwas löslich* und in Aceton, Äthylacetat, Äthyläther sowie in Chloroform, das 50, 10 und 5 Vol.% Äthylacetat enthält, *leichtlöslich*.

Da Bs in Chloroform schwerlöslich ist, wurden Versuche gemacht, aus einer Lösung von Bs und  $\alpha$ -Ketoglutar säure die letztere als 2:4-Dinitrophenylhydrazon mit Chloroform, das 5 Vol.% Äthylacetat enthält, auszuziehen. Um festzustellen, ob alle  $\alpha$ -Ketoglutar säure ausgezogen war, wurde der Rest nach der Extraktion mit Permanganat oxydiert. Darauf wurde die Bs-Bestimmung vorgenommen, nachdem die Bs mit Äther extrahiert worden war (Ausführung siehe S. 64). Es zeigte sich, dass bei der Extraktion praktisch alle Ketoglutar säure entfernt worden war, während praktisch keine Bs ausgezogen war. Die Ergebnisse einer Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die angegebenen Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bs-Bestimmungen.

TABELLE 15.

Rohr-Nr.	1	2	3	4
Zugesetzt $\gamma$ Bs.....	59,0	0	29,5	0
Zugesetzt $\alpha$ -Ketoglutar säure (berechnet als $\gamma$ Bs) .....	0	59,0	29,5	0
Analysenergebnis: $\gamma$ Bs Rückstand nach der Extraktion ...	54	0	32	0
Chloroformextrakt .....	0	—	—	0

Die angegebenen Bs-Werte sind Mittelwerte aus drei oder vier Bestimmungen. — Um festzustellen, dass alle  $\alpha$ -Ketoglutar säure extrahiert wor-

den war, wurde der Rückstand nach der Chloroformextraktion mit Permanganat oxydiert. Erst danach wurde die Bs-Bestimmung ausgeführt.

Wenn man die so isolierte  $\alpha$ -Ketoglutarsäure mit Permanganat oxydiert, wird sie quantitativ in Bs umgewandelt. Mit der neuen Methode zur Bs-Bestimmung müssten sich so auch sehr kleine Mengen  $\alpha$ -Ketoglutarsäure quantitativ bestimmen lassen. Hierbei stösst man jedoch auf gewisse Schwierigkeiten, die besonders untersucht werden müssen. Da dies ausserhalb des Rahmens dieser Arbeit liegt, gehe ich hier nicht darauf ein. Es sei nur bemerkt, dass ein sehr grosser Teil der dem Serum zugesetzten  $\alpha$ -Ketoglutarsäure an den Eiweissniederschlag adsorbiert wird. Frühere Autoren (KREBS 1938, KRUSIUS 1938 und 1940) haben dies nicht beachtet. Ihre Methoden waren für Harn ausgearbeitet und sind dann auf Serum und Gewebssuspensionen angewandt worden (siehe auch KARLSTRÖM et al. 1939).

Bezüglich der Ausführung dieser Methodik zur Bestimmung von Bs in Gegenwart von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (Technik 3) siehe S. 64.

1- $\alpha$ -Oxyglutarsäure wird nur langsam von der Enzymlösung dehydriert. Diese Dehydrierung erreicht ein für die Methode störendes Ausmass nur bei sehr hohen, wahrscheinlich unphysiologischen Konzentrationen der Säure. Man kann vermuten, dass solche Konzentrationen niemals oder äusserst selten in vivo vorkommen. Die Umsetzung dieser Säure ist sowohl in vitro als in vivo sehr wenig untersucht.

Von den physiologisch vorkommenden Stoffen, die die Bs-Bestimmung stören können, sind wahrscheinlich nur  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Hexosediphosphorsäure von Bedeutung. Zur Bestimmung von Bs in Anwesenheit dieser beiden Stoffe ist eine spezielle Methodik ausgearbeitet worden.

Zwei Stoffe sind noch zu nennen, *Malonsäure* und *Pyrophosphorsäure*, die von Bedeutung sein können, da sie bisweilen experimentell Verwendung finden.

*Methode zur Bestimmung von Bs in Gegenwart von Malonsäure* (Technik 4): Bei enzymatischer Bestimmung von Bs muss man zugesetzte Malonsäure eliminieren können. KREBS u. JOHNSON (1937 a) oxydiert die Malonsäure mit Cerisulphat oder Kaliumpermanganat und bestimmt danach die Bs. WEIL-MALHERBE (1937 a) erhitzt die Probe in schwefelsaurer Lösung im Autoklav eine Stunde lang auf 130—135°. Hierdurch wird die Malonsäure vollständig zerstört, während die Bs nicht angegriffen wird. Der Nachteil des Verfahrens, bei Bs-Bestimmung störende Substanzen durch Oxydation zu entfernen, liegt darin, dass dabei einige Stoffe zu Bs oxydiert werden, wie schon von MOYLE (1924) hervorgehoben worden ist. Die Stoffe, mit denen man

diesbezüglich in biologischem Material zu rechnen haben dürfte, sind  $\alpha$ -Oxyglutarsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure.

Umsetzung und Vorkommen der ersteren Säure ist, wie oben erwähnt wurde, wenig erforscht. KREBS (1938) gibt an, die Säure gehe bei Oxydation mit Kaliumpermanganat zu 88 % in Bs über. WEIL-MALHERBE (1937 c) hat dies nicht bestätigen können, sondern findet höchstens 40 % als Bs wieder.

Welche Rolle diese Säure als Fehlerquelle bei Bs-Bestimmungen nach vorheriger Oxydation mit Permanganat spielen kann, wissen wir nicht. Vermutlich keine grosse, denn erstens hat man diesen Stoff bisher nicht in Serum gefunden, zweitens wird er nur zum Teil in Bs oxydiert. Dieser unbekannt Faktor würde völlig ausscheiden, wenn die  $\alpha$ -Oxyglutarsäure von Malonsäure und Bs getrennt werden könnte. Eine geeignete Methode hierfür haben wir nicht finden können.

Die Rolle der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure im intermediären Stoffwechsel ist in den letzten Jahren eifrig erforscht worden (hauptsächlich durch Versuche in vitro). Aus den wenigen bisher ausgeführten in vivo-Versuchen mit Analysen von Serum geht hervor, dass die normale Konzentration im Serum des Menschen etwa 0,7—1,0 mg%, im Serum von Rindern 3—4 mg% beträgt (KREBS 1938, KARLSTRÖM et al. 1939, KRUSIUS 1940). Nach diesen wenigen Analyseergebnissen ist normal hinreichend  $\alpha$ -Ketoglutarsäure vorhanden, um bei Oxydation mit Permanganat verhältnismässig grosse Mengen Bs zu bilden und die Bestimmungsergebnisse stark zu beeinflussen. Die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure muss also zunächst entfernt werden, bevor die Malonsäure oxydiert wird. Anschliessend wird die Malonsäure mit Kaliumpermanganat oxydiert. Die Bs wird wie oben mit Äther extrahiert und endgültig im Schaukelextrakt bestimmt. Für Ausführung, Lösungen usw. verweise ich auf S. 65.

Pyrophosphorsäure ist in dieser Arbeit nicht verwendet worden, da es sich gezeigt hat, dass sie die Succinodhydrogenase nicht spezifisch hemmt, entgegen der ursprünglichen Behauptung (LELOIR u. DIXON 1937). Die enzymatische Dehydrierung von  $\beta$ -Oxybuttersäure wird durch Pyrophosphat stark gehemmt (Literatur bei HOFF-JÖRGENSEN 1940). Deshalb haben wir keine Methode zur Bestimmung von Bs in Anwesenheit von Pyrophosphat ausgearbeitet. Eine solche würde sich jedoch ohne Schwierigkeit angeben lassen, da Pyrophosphorsäure in wässriger Lösung nach und nach spontan in Orthophosphorsäure übergeht. Es handelte sich also nur darum festzustellen, wie lange es dauert, bis diese Reaktion abgeschlossen ist.

### Anwendung der Methode auf biologisches Material.

Bei der Anwendung dieser Methode zur Bs-Bestimmung in biologischem Material (Plasma, Serum u. dgl.) kann man entweder das Enzym direkt auf die Bs in der Probe einwirken lassen, oder man kann zunächst durch irgendeinen Prozess die

Bs von solchen Substanzen im Analysenmaterial isolieren, die die Bestimmung stören können.

Im ersteren Falle kann man die Bestimmung nach der ursprünglich ausgearbeiteten Technik ausführen. Ausser der Enzym-Wasser-Kontrolle ist jedoch noch eine weitere Kontrolle einzusetzen. So gibt es beispielsweise im Plasma Substanzen, die spontan (ohne Enzym) durch Ferricyanid oxydiert werden. Der Ceriverbrauch dieser Stoffe wird durch eine Probe-Wasser-Kontrolle festgestellt, in der die Enzymlösung durch die entsprechende Menge Aqua redest. ersetzt worden ist. Der Ceriverbrauch in dieser Probe wird mit dem der Enzym-Wasser-Kontrolle addiert. Die Summe enthält aber auch den Verbrauch, der erforderlich ist, um *zwei* Indikator-Umschläge zu erzielen, da es sich um *zwei* Titraktionen handelt. Sie ist daher um den Wert eines Umschlags zu vermindern, ehe sie mit dem Ceriverbrauch der Enzym-Analysen-Probe verglichen werden kann. Dieser „korrigierte Kontrollwert“ wird nun vom Ceriverbrauch von Enzym + Probe abgezogen, und das Ergebnis entspricht der Bs-Menge in der Analysenprobe.

LEHMANN (1938) hat für die Grössen, die bei einer solchen Analyse bestimmt werden müssen, folgende Bezeichnungen eingeführt, die auch hier im Prinzip zweckmässig verwendet werden können:

1. *Totalreduktion* = Ceriverbrauch von Blutprobe + Enzym + Ferricyanid-Farbstoff.
2. *Spontanreduktion der Probe* = Ceriverbrauch von Blutprobe + Ferricyanid-Farbstoff.
3. *Spontanreduktion des Enzyms* = Ceriverbrauch von Enzym + Ferricyanid-Farbstoff.
4. *Indikatorwert* = Ceriverbrauch von Ferricyanid-Farbstoff.
5. *Korrigierter Kontrollwert* = 2 + 3 - 4.

1—5 entsprechen der Menge Bs in der Probe.

Für Ausführung, Lösungen usw. verweise ich auf S. 63.

Dass die Bestimmungsmethode zuverlässig ist, zeigt folgender Versuch, wo die Bs-Analyse in Heparinplasma, das mit einer bekannten Bs-Menge versetzt war, ausgeführt wurde. Bei dem Versuch wurde Natriumsuccinatlösung in einen Messkolben abpipettiert, worauf bis zur Marke Plasma

TABELLE 16.

	Analysergebnis: $\gamma$ Bs (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen)							
Kaninchenserum mit 118,1 $\gamma$ Bs pro ml versetzt .....	120	121	127	124	114	117	121	113
Kaninchenserum allein .....	5	5	9	9	1	1	5	0
Differenz .....	115	116	118	115	113	116	116	113



TABELLE 17.

	Analyseergebnis: $\gamma$ Bs (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen)			
Kaninehenserum mit 59,0 $\gamma$ Bs pro ml versetzt .....	78	63	62	53
Kaninehenserum allein .....	20	2	3	0
Differenz .....	58	61	59	53

zugesetzt wurde. Die Volumverhältnisse wurden so gewählt, dass die unvermeidliche Plasmaverdünnung höchstens 9 : 10 betrug.

Die Genauigkeit der Bestimmung von Bs in Plasma, Serum o. dgl. ist geringer als bei Bestimmung von Bs in reinen Lösungen. Im ersteren Falle findet man den Bs-Wert als das Ergebnis von vier Titrationen, im letzteren als das Ergebnis von zweien.

Wie auf S. 52 dargelegt wurde, wird die Bs-Bestimmung durch die Anwesenheit von Hexosediphosphat erheblich gestört. Normal kommt Hexosediphosphorsäure nicht in Plasma oder Serum, wohl aber in Blutkörperchen und Gewebsextrakten vor (Literatur siehe OPPENHEIMER 1939). Diesen störenden Faktor kann man ausschalten, indem man sich der spezifischen Hemmung bedient, welche die Malonsäure auf die Succinodhydrogenase ausübt (siehe S. 53). Aus Tabelle 14, S. 54 geht hervor, dass sich die hier angegebene Technik auch auf Plasma und Serum anwenden lässt. Die Bs-Menge der Probe wird aus dem Unterschied zwischen dem Ceriverbrauch der Probe ohne und der Probe mit Malonat berechnet. Dadurch vereinfacht sich die Berechnung, und vor allem findet man den Bs-Wert als das Ergebnis aus nur zwei Titrationen, statt aus vier, wie in der oben angegebenen Serum-Methodik. Teils aus diesem Grunde, teils auch weil schon minimale Mengen Hexosediphosphat die Bestimmung stören können, haben wir in der letzten Zeit durchweg bei der Bestimmung von Bs in Serum oder Plasma mit dieser „Malonattechnik“ gearbeitet.

Für Ausführung, Lösungen usw. verweise ich auf S. 63).

*Schaukelextraktion von Bs:* In gewissen Fällen empfiehlt es sich, vor der eigentlichen Bs-Analyse die Bs von im Analysenmaterial vorhandenen störenden Substanzen zu scheiden. Bisweilen kann dies notwendig sein, bevor die Probe z. B. der Oxydation mit Permanganat ausgesetzt wird. Am zweckmässigsten ist es, die angesäuerte Probe mit Äther zu extrahieren, wobei man Bs und die übrigen ätherlöslichen Säuren frei von sonstigen Stoffen erhält. Bei kleinen Mengen empfiehlt es sich, diese Extraktion mit Widmarks Schaukelextraktionsmethode auszuführen. (Siehe ausführlicher über Prinzip, Technik usw. bei WIDMARK (1933.)

Die der Ätherextraktion vorangehende Ansäuerung setzt die völlige oder teilweise Ausfällung des Eiweisses der Serumprobe voraus. Es gilt dabei ein solches Fällungsmittel zu wählen, dass die Bs nicht an den Niederschlag adsorbiert wird, was zu niedrige Analysenergebnisse zur Folge hätte.

ÖRSKOV (1931) hat bei Bestimmung der Gesamtmenge ätherlöslicher Säuren im Blut das Eiweiss durch Zusatz von 1 Teil 0,2-n Schwefelsäure, die 16 % Natriumsulphat enthält, zu 2 Teilen Bluthämolyat gefällt. Die Eiweissfällung ist hier sicherlich unvollständig. In Vorversuchen habe ich teils Örskovs Methode probiert, teils denselben Zusatz verwendet, doch anschliessend 15 Min. im Wasserbad erhitzt. In diesem letzteren Falle ist die Eiweissfällung wahrscheinlich vollständig. Im ersteren Falle fand ich bei der Analyse die zugesetzte Bs-Menge quantitativ wieder, im letzteren Falle erhielt ich einen Wert, der 15 % unter dem berechneten lag. Örskovs Methode zur partiellen Fällung der Eiweissstoffe und gleichzeitiger Ansäuerung der Probe ist hier also brauchbar. Das Filtrat aus dieser Fällung ist, wie oben erwähnt, nicht eiweissfrei und darf zweckmässig nicht mit beispielsweise Permanganat versetzt werden. Es ist also notwendig, die Bs irgendwie von einem Teil der übrigen Stoffe zu isolieren, und am leichtesten geschieht dies durch Schaukelextraktion mit Äther.

*Prinzip und Technik der Schaukelextraktion:* In gewöhnlichen Fällen werden ätherlösliche Säuren aus einer angesäuerten wässrigen Lösung mittels eines Extraktionsapparates, z. B. nach Kutscher u. Steudel, extrahiert. Darauf versetzt man den Ätherextrakt mit Wasser, Natronlauge o. dgl., wonach der Äther vertrieben wird. Die ausgezogenen Stoffe befinden sich nun in wässriger Lösung als freie Säuren oder als Natriumsalze. Widmark hat durch Schaukelextraktion diese verschiedene Verfahren in einem zusammengefasst. In ein von ihm konstruiertes Schaukelgefäss wird die Probe in den einen, die Natronlauge in den andern Schenkel abpipettiert, dann wird mit Äther versetzt, so dass der Flüssigkeitsspiegel in eine Kommunikationsröhre hinaufragt. Das Gefäss wird jetzt vorsichtig geschaukelt, um durch dieses Umrühren die Diffusion zu beschleunigen. Dabei wird die undissoziierte Säure im Äther gelöst und diffundiert von dort in die Natronlauge, wo sie Ionen und undissoziiertes Natriumsalz bildet. Da diese beiden Formen der Säure in Äther nicht löslich sind, fungiert der Äther als eine semipermeable Membran, und nach einer gewissen, von verschiedenen Faktoren abhängenden Extraktionszeit ist praktisch alle ätherlösliche Säure als Natriumsalz in die Natronlauge übergeführt.

Die Extraktionsgeschwindigkeit hängt ab von dem Stoff selbst (verschieden für verschiedene Stoffe), der Schaukelgeschwindigkeit, der Neigung der Schaukel beiderseits der Horizontalen, der Grösse und Form des Schaukelgefässes (besonders der Verbindungsrohre). Da die Schaukelgefässe mit der Hand gemacht sind und ihre Form etwas wechseln kann, ist die Extraktionsgeschwindigkeit für verschiedene Schaukelgefässe etwas verschieden. Dieser Faktor ist für jedes Schaukelgefäss konstant und wird ein für allemal bestimmt. Indem man die Extraktion zu verschiedenen Zeitpunkten unterbricht und die jeweils extrahierte Säuremenge bestimmt,

kann man leicht die Zeit berechnen, nach welcher die Hälfte der zugeetzten ätherlöslichen Säure extrahiert ist. Die Zeit der totalen Extraktion entspricht der zehnfachen sog. Halbierungszeit (siehe WIDMARK 1933). Ich habe für Bs-Lösungen und Heparinplasma mit Succinatzusatz die Halbierungszeit für meine verschiedenen Schaukelgefäße festgestellt. Die zur Totalextraktion benötigte Zeit ist nach dem Schaukelgefäß mit der niedrigsten Extraktionsgeschwindigkeit (d. h. mit der niedrigsten Extraktionskonstante) berechnet.

Extraktionsdauer für „totale“ Extraktion von Bs (99,9 %) aus wässriger Lösung von Bs: 3,5 Stunden. Heparinplasma mit Bs: 28 Stunden.

Schaukelgefäß, Mikromodell, nach WIDMARK (1933); Frequenz 12 Schaukelbewegungen pro Minute; Neigung 11°.

Der Schaukelextrakt lässt sich dann für weitere Manipulationen verwenden, z. B. Oxydation mit Kaliumpermanganat, Extraktion von Ketsäuren wie 2:4-Dinitrophenylhydrazonen usw.

Für Lösungen, Ausführung im einzelnen usw. verweise ich auf S. 65.

## Die verschiedenen Modifikationen der Bs-Bestimmung und ihre Anwendung.

### *Übersicht und Zusammenfassung.*

*Ursprüngliche Gestaltung der Bs-Bestimmung* (Prinzip S. 28, Ausführung S. 32): In dieser Gestalt wird die Methode für reine Succinatlösungen und in der Regel auch für Schaukelextrakte aus Plasma, Serum und Harn verwendet.

*Technik 1* (Prinzip S. 58, Ausführung S. 63): Wenn eine Analysenprobe Substanzen enthält, die nicht-enzymatisch durch Ferricyanid oder Cerisulphat oxydiert werden, d. h. wenn die Probe eine Spontanreduktion hat, muss man eine Korrektur einfügen. Dies gilt u. a. von Plasma und Serum.

*Technik 2* (Prinzip S. 53, Ausführung S. 64): Gewisse Enzyme („Saisonvariation“, siehe S. 39) liefern richtige Werte nur mit der „Malonattechnik“, d. h. Technik 2. Diese ist auch anzuwenden, wenn die Probe Hexosediphosphat enthält. Zeigt die Probe Spontanreduktion, so ist es bequemer und besser, konsequent Technik 2 statt Technik 1 zu verwenden.

*Technik 3* (Prinzip S. 54, Ausführung S. 64): Diese Technik kommt zur Anwendung, wenn das Analysenmaterial  $\alpha$ -Ketoglutar säure enthält. Da es in der Regel ungewiss ist, ob Plasma- oder Serumproben diese Säure enthalten, und da Technik 3 umständlich und zeitraubend ist, habe ich es vorgezogen, in unsicheren Fällen mit Technik 2 zu arbeiten. Bs-Bestimmung nach Technik 3 wird nur in einer kleineren Zahl von Proben

gleichzeitig ausgeführt. Die Erfahrung hat hierbei gezeigt, dass die mit Technik 2 in Plasma oder Serum gefundenen Bs-Werte bisweilen etwas *zu niedrig, aber nie zu hoch* waren.

*Technik 4* (Prinzip S. 57, Ausführung S. 65): Diese Technik kommt zur Anwendung, wenn die Proben Malonsäure enthalten.

Die Bestimmung von Bs nach Technik 3 und 4 lässt sich bei Plasma, Gewebsextrakt, Harn u. dgl. nicht direkt ausführen, sondern erst nach vorheriger *Schaukelextraktion mit Äther* (Prinzip S. 60, Ausführung S. 65).

### Ausführung der verschiedenen Modifikationen der Bs-Bestimmung.

*Ursprüngliche Form* der Bs-Bestimmung siehe S. 32.

*Technik 1*: Wegen des hohen Eiweissgehaltes in Plasma und Serumproben wird am Ende der Dehydrierung 1,0 ml Trichloressigsäure statt 0,5 ml zugesetzt. Dies einmal, um einer allzu unvollständigen Eiweissfällung vorzubeugen, zum andern, um eine genügende Flüssigkeitsmenge zu erhalten, so dass nach dem Zentrifugieren 2 ml zur Titration abgenommen werden können. Die Eiweissfällung ist in diesen Fällen so gross, dass sich bei einem Zusatz von nur 0,5 ml Trichloressigsäure unmöglich 2 ml abpipettieren lassen. Um im Reaktionsgemisch nach der Eiweissfällung dieselbe Trichloressigsäurekonzentration zu erhalten, nämlich 5 %, muss die zugesetzte Trichloressigsäure in diesen Fällen 35 %ig statt 30 %ig sein.

Reagenzien und Lösungen: 35 %ige Trichloressigsäure: 35 g Acidum trichloracetieum (Merck) + Aqua redest. ad 100 ml.

Im übrigen wie bei der ursprünglichen Methodik, S. 30.

Die Ausführung geht aus folgendem Beispiel hervor:

Röhrchen Nr.	1	2	3	4
Ferrieyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Plasma (Analysenprobe) .....	1,0	1,0	—	—
Aqua redest. ....	—	0,5	1,0	1,5
Enzym .....	0,5	—	0,5	—
Trichloressigsäure, 35 % .....	1,0	1,0	1,0	1,0

Sämtlichen Proben werden nach dem Zentrifugieren 2,0 ml entnommen. Zusatz von Wasser und 18-n Schwefelsäure wie üblich (S. 32) Ceriverbrauch.

Die Verdünnung der Probe ist hier eine andere als bei der ursprünglichen Methode; von 1,0 ml auf 3,5 ml. Bei der Berechnung verwenden wir folglich einen anderen Faktor, der in gleicher Weise wie der ursprüngliche berechnet wird, siehe S. 33.

$$\frac{3,5 \cdot 118,1}{2 \cdot 2} \cdot \frac{2}{a} = 103,33 \cdot \frac{2}{a}$$

Ceriverbrauch bei Titerstellung: 2,050 (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

$$\text{Faktor: } \frac{2}{2,050} \cdot 103,33 = 100,7.$$

Spontanreduktion der Probe (Röhrchen 2): 1,160 ml Ceriumsulfatlösung

des Enzyms ( 3): 0,840

Zusammen 2,000

minus Indikatorwert ( 4): 0,360

Korrigierter Kontrollwert : 1,640

Gesamtreaktion (Röhrchen 1): 1,685

minus korrigierter Kontrollwert 1): 1,640

Der Bs-Menge der Probe entsprechend : 0,045

*Ergebnis:* Die Probe enthält  $0,045 \cdot 100,7 = 5 \gamma$  Bs.

*Technik 2:* Reagenzien und Lösungen: 0,10-mol. Stamm-Malonatlösung: 0,5200 g Acidum malon. (Merck) + 10,0 ml 1,0-n-Natronlauge, Aqua redest. ad 50 ml.

Ferrieyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung mit Malonat: 20 ml 0,05-mol. Stamm-Ferrieyanidlösung + 10 ml 2 : 6-Dichlorophenolindophenollösung 1 : 2000 + 10 ml 0,1-mol. Stamm-Malonatlösung werden mit M/15 Phosphat pH 7,38 ad 100 ml versetzt.

Sonstige Lösungen und Bereitung der genannten Stammlösungen siehe S. 30.

Die Ausführung geht aus folgendem Beispiel hervor:

Röhrchen Nr.	1	2
Ferrieyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung .....	1,0 ml	—
Ferrieyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung mit Malonat —	—	1,0 ml
Plasma (Analysenprobe) .....	1,0	1,0
Enzym .....	0,5	0,5
Trichloressigsäure, 35 % .....	1,0	1,0

Ceriverbrauch : 0,910 ml 0,875 ml

Differenz zwischen Röhrchen 1 und Röhrchen 2: 0,035 ml

(der Bs-Menge in der Probe entsprechend)

Ceriverbrauch bei Titerstellung : 1,975 ml (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

Zur Berechnung wird derselbe Faktor verwendet wie bei Technik 2, S. 63.

$$\frac{2}{1,975} \cdot 103,33 = 104,6.$$

*Ergebnis:* Die Probe enthält  $0,035 \cdot 104,6 = 4 \gamma$  Bs.

*Technik 3:* Reagenzien und Lösungen: 2 : 4-Dinitrophenylhydrazinlösung: 0,050 g 2 : 4-Dinitrophenylhydrazin (Schuelhardt) + 10 ml 6-n Schwefelsäure (aus 18-n bereitet). Die Lösung wird täglich frisch bereitet.

Chloroform mit 5 Vol. % Äthylacetat: Chloroform gemäss Svenska Farmakopén Ed. X. 190 ml + 10 ml Äthylacetat (Kahlbaum zur Analyse).

Wenn es sich um biologisches Analysenmaterial handelt, muss diesem Verfahren Schaukelextraktion der Bs vorangehen. — Die Probelösung oder der Schaukelextrakt wird quantitativ in einen Scheidetrichter (25—50 ml) gebracht und mit 0,5 ml 2:4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt. Nach einer halben Stunde wird die Probe mit Chloroform, das 5 Vol.% Äthylacetat enthält, extrahiert, 5 ml 3mal. Der nach der Extraktion zurückbleibende Rest wird quantitativ in einen kleinen Becher gebracht und über dem Wasserbad auf etwa 2 ml Volumen eingedampft, worauf die Lösung quantitativ zur Extraktion in ein Schaukelgefäss gefüllt wird. Zur Ausführung der Schaukelextraktion siehe unten. Die Bs-Analyse des Schaukel-extraktes wird in der S. 66 angegebenen Weise ausgeführt.

*Technik 4:* Bei der Analyse biologischen Materials ist erst die Schaukel-extraktion mit Äther vorzunehmen (siehe unten). Aus dem Schaukelextrakt wird dann die  $\alpha$ -Ketoglutar säure nach Technik 3 entfernt. Der Rest wird über dem Wasserbad auf etwa 2 ml Volumen eingedampft. Nachdem die Probe sich auf Zimmertemperatur abgekühlt hat, wird sie mit 0,5 ml 18-n Schwefelsäure und dann tropfenweise mit 1-n Kaliumpermanganat versetzt, bis die sich ergebende Blaufärbung 15 Minuten bestanden hat. Dann wird 2 %iges Natriumbisulfit zugesetzt, so dass die Blaufärbung verschwindet und aller Niederschlag (Braunstein, Manganhydroxyd) sich löst. Die Lösung wird auf etwa 2 ml Volumen eingedampft und dann quantitativ in den Diszipienten eines Schaukelgefässes gebracht. Die Ausführung der Schaukelextraktion sowie die endgültige Bs-Analyse im Schaukelextrakt wird nachstehend beschrieben.

Zur Berechnung siehe die Darstellung der Schaukelextraktion S. 66.

*Schaukelextraktion:* Es wurden Schaukelgefässe vom Mikromodell nach WIDMARK (1933) verwendet, die Grösse ist aus den dort angegebenen Massen zu entnehmen. Schaukeelfrequenz 12/Min. Neigung 11°. Extraktionsdauer der Totalextraktion der Bs: für nicht eiweisshaltige Lösungen 3,5 Stunden; für eiweisshaltige Lösungen (wie Plasma und Serum) 18 Stunden.

Reagenzien und Lösungen: 0,2-n Schwefelsäure, 16 % Natriumsulfat enthaltend: 16 g wasserfreies Natriumsulfat (Merek) + 0,2-n Schwefelsäure (dargestellt aus 18-n Schwefelsäure) ad 100 ml.

0,10-n Natronlauge.

0,10-n Salzsäure.

Phenolphthalein, 1 ‰ Lösung in Alkohol.

Peroxydfreier, säurefrei Äther: Äthyläther, nach Svenska Farmakopén Ed. X, in dunkler Flasche über festem Bariumhydroxyd aufzubewahren.

Die Ausführung geht aus folgendem Beispiel hervor:

	Dizipient	Rezipient
Analysenprobe <sup>1</sup> .....	3,0 ml	—
0,2-n Schwefelsäure, 16 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> enthaltend ..	1,5	—
0,10-n NaOH .....	—	2,5 ml
Äthyläther wie oben .....		37 ml

Nach Abschluss der Extraktion wird der Inhalt des Rezipienten quantitativ in ein flachbodiges Titrierglas (Modell siehe S. 32) gebracht. Die Lösung wird mit 1 Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt, und die Rotfärbung garantiert, dass im Rezipienten ein Überschuss von NaOH vorhanden war. Dann versetzt man mit 2,5 ml 0,10-n HCl und titriert mit 0,10-n NaOH, bis eine leichte Rosafärbung eintritt. Dadurch erfährt man die Gesamtmenge an ätherlöslichen Säuren in der Probe.

Bei sehr hohem Bs-Gehalt der Analysenprobe, wie er bisweilen in Harn vorkommt, wird diese Titration statt dessen in einem 10 ml grossen Messkolben ausgeführt, worauf man bis zur Marke mit Aqua redest. verdünnt und die Bs-Analyse dann in dieser verdünnten Lösung vornimmt.

Bei Extraktion von Plasma, Serum und Harn mit mässig erhöhtem oder normalem Bs-Gehalt empfiehlt es sich, die Probe im Trockenschrank völlig einzudampfen. Nach dem Abkühlen wird die Probe in einer bestimmten Menge Aqua redest. gelöst und die Bs-Bestimmung an dieser Lösung vorgenommen. Dabei ergibt sich ein kleiner Verdünnungsfehler, der indessen für die Genauigkeit der weiteren Analyse keine Rolle spielt. In der endgültigen Analysenprobe ergibt sich auf diese Weise eine höhere Bs-Konzentration, als wenn man den Schaukelextrakt nach der Titration auf ein bekanntes Volumen verdünnt und dann die Bs analysiert. Dies ist ein grosser Vorteil, wenn die Bs-Konzentration der ursprünglichen Probe sehr niedrig ist (z. B. Plasma und Serum).

In der Regel zeigt Schaukelextrakt von Plasma und Serum keine „Spontanreduktion“. Man versetzt deshalb die eingedampfte Probe zweckmässig mit 2,5 ml Aqua redest., so dass man 2 ml für 2 Bs-Bestimmungen abpipettieren kann. Will man feststellen, ob die Probe Spontanreduktion zeigt, so muss man die Probe in 4,5 ml statt in 2 ml Aqua redest. auflösen, damit man 4 ml zur Doppelbestimmung erhält. Dabei arbeitet man mit Technik 1 oder noch besser mit Technik 2.

Enthält die Probe  $\alpha$ -Ketoglutarsäure oder Malonsäure, so wird der Schaukelextrakt mit Technik 3 bzw. Technik 4 behandelt.

Berechnung: Der Schaukelextrakt wird bis zur Trockenheit eingedampft und in 2,5 ml Aqua redest. gelöst. Von dieser Lösung pipettiert man 1 ml für eine Bs-Bestimmung ab (zweckmässig macht man Doppelbestimmungen). Den dabei erhaltenen Bs-Wert nennen wir B $\gamma$ . In der ganzen Menge Schaukelextrakt findet sich also B. 2,5  $\gamma$  Bs. Diese Menge ist aus

<sup>1</sup> Ist die Probe eiweisshaltig (Serum, Plasma), so bildet sich ein Niederschlag. Um vollständige Extraktion zu erzielen, empfiehlt es sich, den Niederschlag von Zeit zu Zeit umzurühren.

3 ml ursprünglicher Probelösung extrahiert worden. Das ursprüngliche Analysenmaterial enthält also  $\frac{B \cdot 2,5}{3}$   $\gamma$  Bs pro ml.

*Dasselbe Berechnungsprinzip findet Anwendung, wenn der Schaukel-extrakt nach dem Eindampfen in einer anderen Menge Aqua redest. (z. B. 4,5 ml) gelöst wird, sowie bei Schaukelextrakten, die mit Technik 3 oder 4 bearbeitet worden sind.*

---



### KAPITEL III.

## Die Hemmung der Bs-Dehydrierung und der Fumarsäure-Hydrierung durch Malonsäure.

Um die Rolle der Bs und der Succinodehydrogenase im intermediären Stoffwechsel näher zu erforschen, ist es wichtig, die Wirkung zu studieren, die sich bei einer spezifischen Hemmung dieses Enzyms *in vitro* und *in vivo* einstellt. Auf die Lösung dieses Problems ist viel Mühe verwandt worden. — Drei Stoffe hemmen bereits in sehr schwachen Konzentrationen die Succinodehydrogenase: Malonsäure, Pyrophosphorsäure (LELOIR u. DIXON 1937) und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (WEIL-MALHERBE 1937, eigene unveröffentlichte Versuche). Die Hemmung der Succinodehydrogenase durch die Pyrophosphorsäure ist nicht spezifisch (siehe HOFF-JÖRGENSEN 1940). Die Hemmung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ist nur wenig untersucht. Die hemmende Wirkung der Malonsäure auf die Succinodehydrogenase dagegen ist bei Umsetzungsversuchen *in vitro* weitgehend gebraucht worden. In der Erörterung der C<sub>4</sub>-Säurentheorie, des Citronensäurezyklus und verwandter Probleme nehmen die Malonatversuche eine zentrale Stellung ein.

Die hemmende Wirkung des Malonats auf die Bs-Dehydrierung wurde erstmalig von QUASTEL und seinen Mitarbeitern festgestellt (QUASTEL 1926, QUASTEL u. WOOLDRIDGE 1928). Sie betrachteten die Hemmung als spezifisch für die Succinodehydrogenase und führten sie auf die Konstitutionsähnlichkeit der genannten Säure mit Bs zurück. Die Malonsäure wird wegen dieser Ähnlichkeit mit grosser Affinität an das Enzym adsorbiert und verdrängt so Bs von der verfügbaren Enzymoberfläche. Da das Malonat nicht umgesetzt wird, ergibt sich hierdurch eine starke Hemmung der Bs-Dehydrierung. SZENT-GYÖRGYI schliesst sich dieser Ansicht, dass Malonat die Succinodehydrogenase *spezifisch* hemme, an. WEIL-MALHERBE (1937) dagegen ist der Ansicht, dass die Malonathemmung nicht ganz spezifisch für das genannte Enzym ist. Gegenüber den Arbeiten dieses und anderer Forscher, in denen Malonathemmung auch bei anderen Dehydrie-

rungen nachgewiesen worden ist, versucht SZENT-GYÖRGYI geltend zu machen, dass die dort konstatierte Hemmung letzten Endes auf einer Hemmung der Succinodehydrogenase beruhe. Er ist bekanntlich der Meinung (SZENT-GYÖRGYI 1937 a), dass die C<sub>4</sub>-Säuren beispielsweise auch für die Dehydrierung von Hexosediphosphat im Thunberg-Versuch notwendig seien.

Demgegenüber kann festgestellt werden, dass aerobe Umsetzung von Hexosediphosphat in vitro durch Malonsäure nicht gehemmt wird. Die dabei angewandte Malonatkonzentration hemmt indessen *vollständig* die Oxydation zugesetzter Bs. Auf Grund dieser Versuche ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Oxydation von Hexosediphosphat in vitro auf das C<sub>4</sub>-Säurensystem zurückzuführen ist (POTTER 1940).

Die Frage, ob die Malonathemmung absolut spezifisch ist oder nicht, ist somit als noch nicht endgültig beantwortet zu betrachten.

Die für die C<sub>4</sub>-Säuretheorie und die hierhergehörigen Fragen so wichtigen Malonatversuche wurden schon besprochen (siehe S. 8). Hier sei nur bemerkt, dass Malonsäure in vitro bloss die Atmungszunahme hemmt, die nach Zusatz von Bs auftritt, nicht aber die Atmungssteigerung bei Zusatz von Fumarat. SZENT-GYÖRGYI erklärt dies damit, *Malonsäure hemme die Bs-Dehydrierung viel stärker als die Fumarsäurehydrierung*. Eine Kritik dieses Gesichtspunktes wurde oben (S. 14) gegeben. SZENT-GYÖRGYI stützt sich bei dieser Erklärung auf Versuche von DAS (1937). Dieser Autor ermittelte nach einer neuen Methode die Menge Malonsäure, die unter gewissen bestimmten Versuchsbedingungen eine 50 %ige Hemmung der Fumarsäurehydrierung und der Bs-Dehydrierung hervorrief. Die Versuche hatten das überraschende Ergebnis, dass für eine solche Hemmung der ersteren Reaktion eine 5mal grössere Malonsäurekonzentration erforderlich ist als für die entsprechende Hemmung der letzteren Reaktion. Die Versuchsmethodik lässt indessen Zweifel an den Ergebnissen wach werden. Die Bs-Dehydrierung wird im Thunberg-Versuch (nach der Modifikation von SZENT-GYÖRGYI 1935) mit 2:6-Dibromophenolindophenol als Indikator gemessen. Bei der Hydrierung der Fumarsäure dient Leuko-neutralrot als Redoxindikator. Diese Versuche mit Fumarsäure wurden in einem speziell dafür konstruierten Apparat ausgeführt, in welchem Neutralrot vor dem Versuch im Vakuum durch einen leichten Überschuss von Natriumhydrosulfit reduziert wird. Darauf setzt man im Vakuum Enzym und Fumarat zu. Die Zeit, die zwischen dem Augenblick des Zusetzens dieser Stoffe bis zum *ersten Erscheinen der roten Farbe des Neutralrot* verstreicht, wird als Hydrierungszeit angegeben. Dabei aber fungiert ja der Überschuss an *Natriumhydrosulfit als Wasserstoffdonator*. Das Leuko-neutralrot dient nur als Indikator dafür, dass der Überschuss an Natriumhydrosulfit verbraucht ist. Es ist äusserst zweifelhaft, ob man zwei so verschiedene Reaktionen wie die Hydrierung von Fumarsäure mit Natriumhydrosulfit und die Bs-Dehydrierung mit 2:6-Dibromophenolindophenol als Wasserstoffacceptor miteinander vergleichen kann. Ausserdem müssen die Ergebnisse der Fumarsäurehydrierung von Versuchsreihe zu Versuchsreihe wechseln, da der Überschuss an Natriumhydrosulfit nicht exakt der-

selbe ist, sondern nur so viel zugesetzt wird, dass der Farbstoff „etwas überreduziert“ wird.

Die Oxydation der Bs zu Fumarsäure durch die Succinodehydrogenase ist eine reversible Reaktion (J. LEHMANN 1930). Einer der Mitarbeiter Szent-Györgyis (K. LAKI 1935, S. 33) hat gezeigt, dass Bs und Fumarsäure gleich grosse Affinität für dieses Enzym besitzen. Dann ist es theoretisch unwahrscheinlich, dass die Malonathemmung stärker ist, wenn die Reaktion in der einen Richtung abläuft, als wenn sie in der entgegengesetzten Richtung erfolgt. Hierauf weist auch OPPENHEIMER (1939) in seiner Kritik der Szent-Györgyischen Theorie hin.

Es wäre daher sehr wünschenswert, wenn man experimentell mit einer zufriedenstellenden Methodik entscheiden könnte, ob die Malonsäure die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäure-Hydrierung im gleichen Grade hemmt oder nicht. Diesbezügliche Versuche werden nachstehend geschildert.

*Methodik:* Will man die quantitativen Verhältnisse bei Hemmung einer reversiblen Reaktion untersuchen, so müssen die Versuchsbedingungen bei dem Ablauf der Reaktion in beiden Richtungen möglichst dieselben sein. Untersucht man die Dehydrierung von Bs mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor, so muss die Hydrierung von Fumarsäure mit Leukomethylenblau als Wasserstoffdonator geschehen. Im übrigen sollen die Versuchsbedingungen, die Konzentration der an der Reaktion teilnehmenden Stoffe, der pH usw. identisch sein. Wenn man unter diesen Verhältnissen für die beiden Reaktionen die prozentuale Hemmung bestimmt, die eine geeignete, in Vorversuchen ausprobierte Malonatkonzentration hervorruft, so wird man berechtigt sein können, die Ergebnisse in beiden Fällen miteinander zu vergleichen. Unter diesen Versuchsbedingungen verschiebt sich das Redoxpotential des Systems bei beiden Reaktionen genau längs derselben Kurve.

Die exakteste Methode, den Reaktionsablauf bei der Dehydrierung der Bs zu verfolgen, dürfte es sein, durch Redoxpotentialmessungen die Verschiebung dieses Potentials mit fortschreitender Reaktion zu verfolgen. Um die Hydrierung von Fumarsäure zu untersuchen, lässt man die gleiche Menge Methylenblau wie im vorigen Falle durch eine kleine Menge Bs zu Leukomethylenblau dehydrieren. Dann versetzt man mit Fumarsäure, und durch Potentialmessungen folgt man den Reaktionsablauf der Hydrierung.

Wenn sowohl die Dehydrierung als die Hydrierung untersucht werden soll, empfiehlt es sich, als Wasserstoffacceptor (bzw. Wasserstoffdonator) und Potentialvermittler einen Redoxindikator zu benutzen, dessen Potential dem des Succinat-Fumarat-Systems möglichst nahe kommt. Methylenblau ist für diesen Zweck am geeignetsten. Wird das Redoxpotential ( $E_0$ )

des Succinat-Fumarat-Systems (LEHMANN 1930, S. 105, Tabelle 8) und dasjenige des Methylenblau-Leukomethylenblau-Systems als Funktion des pH dargestellt, so schneiden sich diese Kurven in einem Punkte, der  $E'_0$  0,013 Volt und pH 6,79 entspricht. Das Redoxpotential des Methylenblau-Leukomethylenblau-Systems (CLARK 1925) ist zuerst für 37,8° umgerechnet worden. Dabei wurde der Temperaturkoeffizient 0,00073 Volt/Grad Celsius verwendet (HOLST 1938).

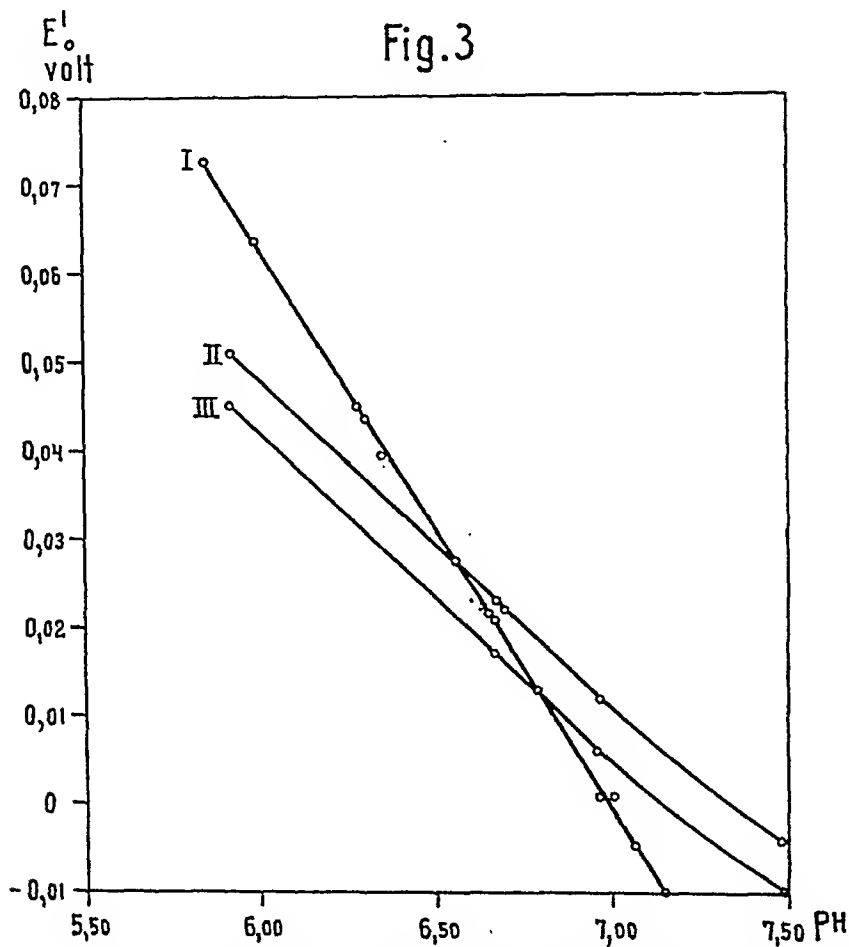


Fig. 3. I. Bs/Fumarsäure. II. Methylenblau/Leukomethylenblau bei 30°. III. Methylenblau/Leukomethylenblau bei 37,8°.

Das pH-Optimum der Succinodehydrogenase im Methylenblau-Versuch (LEHMANN 1930) ist 7,7. Auf der alkalischen Seite dieses pH nimmt die Aktivität sehr schnell ab, auf der sauren Seite langsamer. Bei pH 6,79 ist die Aktivität der Succinodehydrogenase erheblich geschwächt. Es empfiehlt sich deshalb kaum, die Versuche bei diesem pH auszuführen, da das Enzym bei langer Reaktionsdauer irreversible Veränderungen erfahren kann. Ich habe daher meine Versuche bei pH 7,02 und 7,18 gemacht. Der

Unterschied zwischen dem  $E_0'$  der beiden Systeme beträgt bei diesen pH nur 0,005 bzw. 0,010 Volt. Durch Vorversuche im Thunbergversuch wird die Malonatmenge ermittelt, welche die Dehydrierung zu etwa 50 % hemmt. Dieser Hemmungsgrad dürfte am geeignetsten sein. Man erzielt damit eine Wirkung, die mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Methode genügend stark ist. Mit stärkerer Hemmung zu arbeiten, ist nicht ratsam, da die Reaktionszeit dadurch so in die Länge gezogen werden kann, dass das Enzym sich irreversibel verändern kann.

Die Succinodehydrogenase muss selbstverständlich frei von Fumarase sein, wenn man richtige Potentiale erhalten will. Die Enzymlösung wurde aus Schweineherz nach einer Modifikation der Lehmannschen Methode (LEHMANN 1940, LEHMANN u. HOFF-JÖRGENSEN 1939) dargestellt.

Die Enzymlösung wird vor dem Versuch mit Hilfe von HCl oder NaOH auf den gewünschten pH gebracht.

Damit man genügend viele Potentialmessungen ausführen kann, darf die Reaktionsgeschwindigkeit nicht zu hoch sein. Im Methylenblauversuch wird durch Änderung der Enzymmenge eine passende Entfärbungszeit, etwa 15 Min., gefunden. Die Methylenblau-Menge (100  $\gamma$ ) ist nach LEHMANN (1940) gewählt.

Im Vorversuch zeigte sich, dass 0,4 ml der angewandten Enzymlösung eine passende Reaktionszeit gibt und dass ein Zusatz von 0,2 ml 0,01-molarer Malonatlösung eine etwa 50 %ige Hemmung bewirkt. Das totale Reaktionsvolumen beträgt 3,0 ml.

Zur Technik der Redoxpotentialmessung siehe LEHMANN (1940).

Für die Redoxpotentialmessungen wurden Redoxgefäße nach LEHMANN (1940) benutzt, mit einem Annex zur Einfüllung der Lösungen, die erst nach der Evakuierung zugesetzt werden sollen. In das Gefäß selbst werden Phosphatpuffer, Enzym und evtl. Malonat gebracht. Mit der Ölpumpe wird dann 5 Minuten lang evakuiert, die letzten 2 Minuten wird das ganze Redoxgefäß ins Wasserbad getaucht. Dann wird unter vorsichtigen Umrühren das im Annex befindliche Methylenblau und Succinat zugegossen. Der Augenblick des Zugießens bezeichnet den Beginn der Reaktion. Das Element, dessen EMK nun gemessen wird, besteht einerseits aus Enzym-Succinat-Methylenblau im Redoxgefäß und blanker Pt-Elektrode, andererseits aus einem Röhrchen mit Veibel-Lösung und Chinhydron und blanker Pt-Elektrode. Diese beiden Halbelemente werden durch eine Brücke von Kaolin-Agar verbunden (LEHMANN 1930). Das Röhrchen mit Chinhydron-Veibel muss gut verschlossen sein, da sonst wegen der Flüchtigkeit des Chinons das Redoxgleichgewicht gestört werden kann.

Bei der Fumaräthydrierung wird das Leukomethylenblau in der Weise dargestellt, dass dieselbe Menge Methylenblau wie in den Bs-Dehydrierungsversuchen mittels der kleinstmöglichen Menge Succinat entfärbt wird. Nachdem die Reaktion, deren Verlauf durch Messung des Redoxpotentials verfolgt wird, zum Stillstand gekommen ist, wird das Fumarat zugesetzt. Bei Hemmungsversuchen wird das Malonat nach eingetretener Entfärbung zugegossen und die Fumarsäure erst nach weiteren 5 Min. zugesetzt. In

diesen Fällen ist die Redox-Quote (Bs/Fumarsäure) bei Beginn des Versuchs etwa  $\frac{1}{10}$ .

Nach dem Redoxversuch wird der pH des Reaktionsgemisches nach Zusatz von Chinhydron elektrometrisch gemessen. Es ist hierbei wichtig, dass das Leukomethylenblau vollständig oxydiert ist, bevor das Chinhydron zugesetzt wird. HOFF-JÖRGENSEN (1938) empfiehlt kräftiges Schütteln mit Luft während mindestens 5 Minuten.

Das Reaktionsgemisch war von folgender Zusammensetzung. (Jedes Röhrchen mit 0,4 ml Enzymlösung versetzt.)

TABELLE 18.

Rohr-Nr.	1.	2.	3.	4.
m/15 Phosphat (von erwünschtem pH) .....	2,2 ml	2,0 ml	2,0 ml	1,8 ml
Methylenblau 1 : 2000 .....	0,2	0,2	0,2	0,2
0,1—mol. Succinat .....	0,2	0,2	—	—
0,01—mol. » .....	—	—	0,2	0,2
0,1—mol. Fumarat .....	—	—	0,2	0,2
0,01—mol. Malonat .....	—	0,2	—	0,2

TABELLE 19.

*Bs-Dehydrierung.*

Rohr Nr. 1		Rohr Nr. 2	
Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden	Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden
0,527	1.54	0,527	2.45
0,537	2.18	0,537	3.14
0,543	2.46	0,548	4.30
0,548	3.15	0,555	5.27
0,555	3.52	0,561	6.45
0,561	4.21	0,566	8.27
0,566	5.21	0,571	10.00
0,571	6.15	0,577	11.51
0,577	7.06	0,581	13.24
0,581	7.55	0,584	14.21
0,584	8.54	9,589	16.12
0,589	10.12	0,595	18.24
0,595	11.54		
pH nach dem Versuch 7,18		pH nach dem Versuch 7,18	

TABELLE 20.

*Fumarsäure-Hydrierung.*

Rohr Nr. 3		Rohr Nr. 4	
Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden	Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden
0,594	0.00	0,593	0.00
0,584	0.27	0,579	1.00
0,579	0.58	0,572	2.57
0,572	1.45	0,565	5.27
0,565	2.54	0,561	7.45
0,561	4.00	0,556	9,54 (?)
0,556	5.45	0,555	10.30
0,550	9.33	0,550	15.54
pH nach dem Versuch 7,18		pH nach dem Versuch 7,18	

Die Redoxpotentialmessungen wurden in der Weise ausgeführt, dass ich die Zeiten bestimmte, wo das Potential des Systems einer Reduktion des Methylenblaus von etwa 30 %, 40 %, 50 % usw. entsprach. Tabelle 19 u. 20 zeigen die Ergebnisse dieser Potentialmessungen.

*Berechnung:*  $E_0$  des Chinhydrons 0,6901 Volt. pH der Veibel-Lösung 2,04.

Bei 37° ist das  $E_0'$  des Chinhydron-Veibel-Halbelements 0,6901 — 0,0615 · 2,04 = 0,5646 Volt.

Nach Fig. 3 S. 71 ist das  $E_0'$  des Methylenblau/Leukomethylenblau bei pH 7,02 = 0,005 Volt, bei pH 7,18 = 0,000 Volt.

Bei 50 %iger Oxydation ist also das Potential bei einem pH von 7,02 0,565 — 0,005 = 0,560 Volt, bei pH 7,18 0,565 — 0,000 = 0,565 Volt.

Von diesen beiden Potentialen ausgehend, berechnet man mit Hilfe von Tabelle 1, S. 15, LEHMANN (1930) die Potentiale der verschiedenen Redox-Quoten Fig. 4, S. 75. Mit Hilfe der obigen Kurve wird der Prozentsatz der Oxydation für die abgelesenen Potentiale ermittelt.

Für die endgültige Berechnung wird nur der Teil der Kurve verwendet, der in der Hauptsache geradlinig verläuft. Dies u. a. deshalb, weil bei mehr waagerechtem Kurvenverlauf die Fehler der aus der Kurve erhaltenen Zeiten relativ grösser sind.

Verlängert man die Kurve über ihren Anfang hinaus, so geht diese Linie nicht durch die Origo. Es vergeht also eine gewisse Latenzzeit, bis die Reaktion ihre volle Geschwindigkeit erreicht hat. Den Grund dessen kennen wir nicht. Möglicherweise vergeht eine kurze Zeit, ehe die Bs an das Enzym adsorbiert ist.

Zur Berechnung wird nur die Kurvenstrecke beispielsweise zwischen 20 %iger Reduktion und 50 %iger Reduktion ausgewertet, denn bei der Fs-Hydrierung beginnt der Versuch bei etwa 80 %iger Reduktion. Da-

Fig. 4

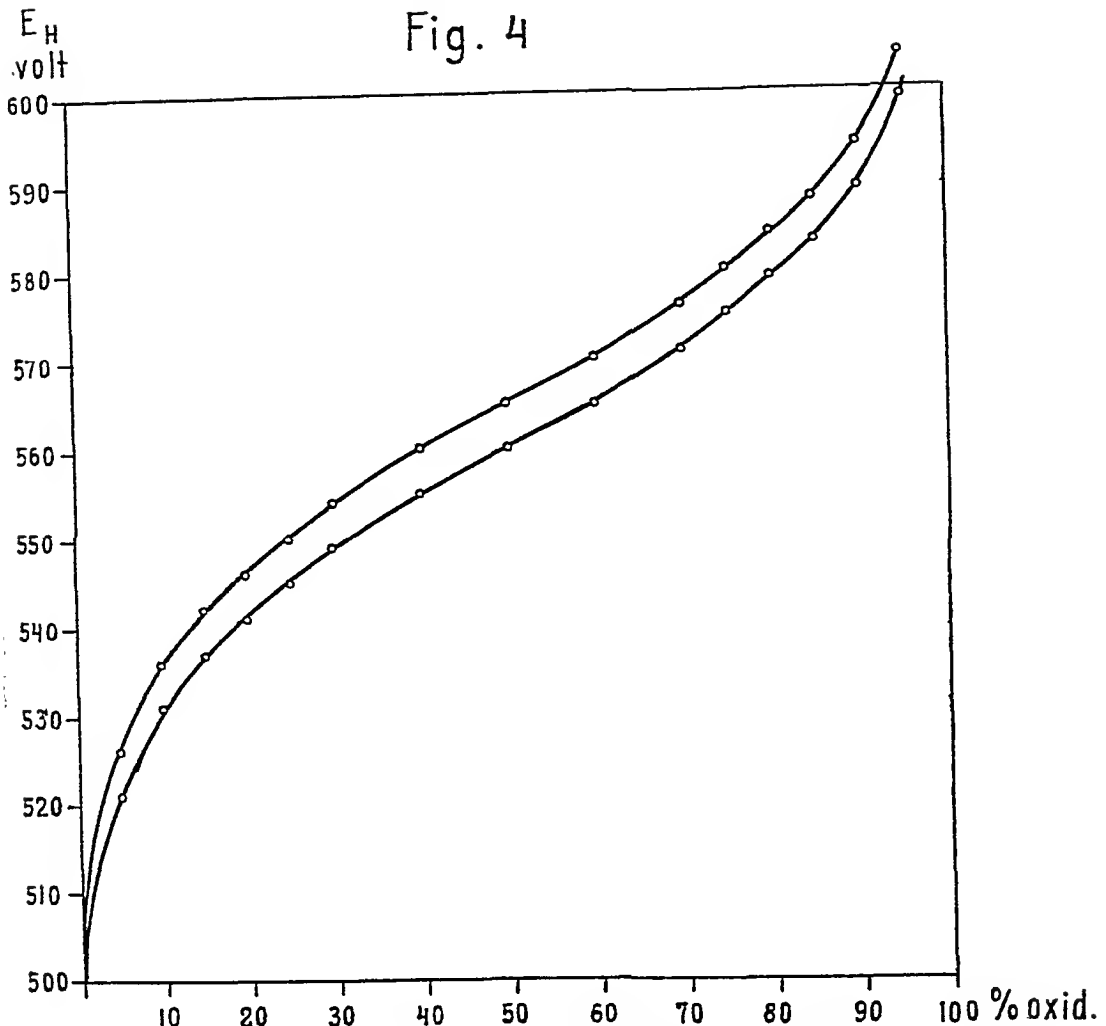


Fig. 4. Obere Kurve bei pH 7,18. Untere Kurve bei pH 7,02.

durch macht man sich unabhängig von dem unbekanntem Faktor, der die besagte Latenzzeit verursacht.

Die schliessliche Berechnung wird folgendermassen ausgeführt:

Zeitdauer z. B. der 20 %igen Umsetzung: A Min.

„ „ „ „ 50 %igen „ : B Min.

„ der Umsetzung 20—50 % : B—A Min.

Entsprechender Wert der Malonatkurve : B'—A' Min.

Der invertierte Wert der Zeit ist ein Massstab der Reaktionsgeschwindigkeit während der gegebenen Zeit.

$$\frac{1}{B - A} = \frac{1}{b}$$

$$\frac{1}{B' - A'} = \frac{1}{m}$$



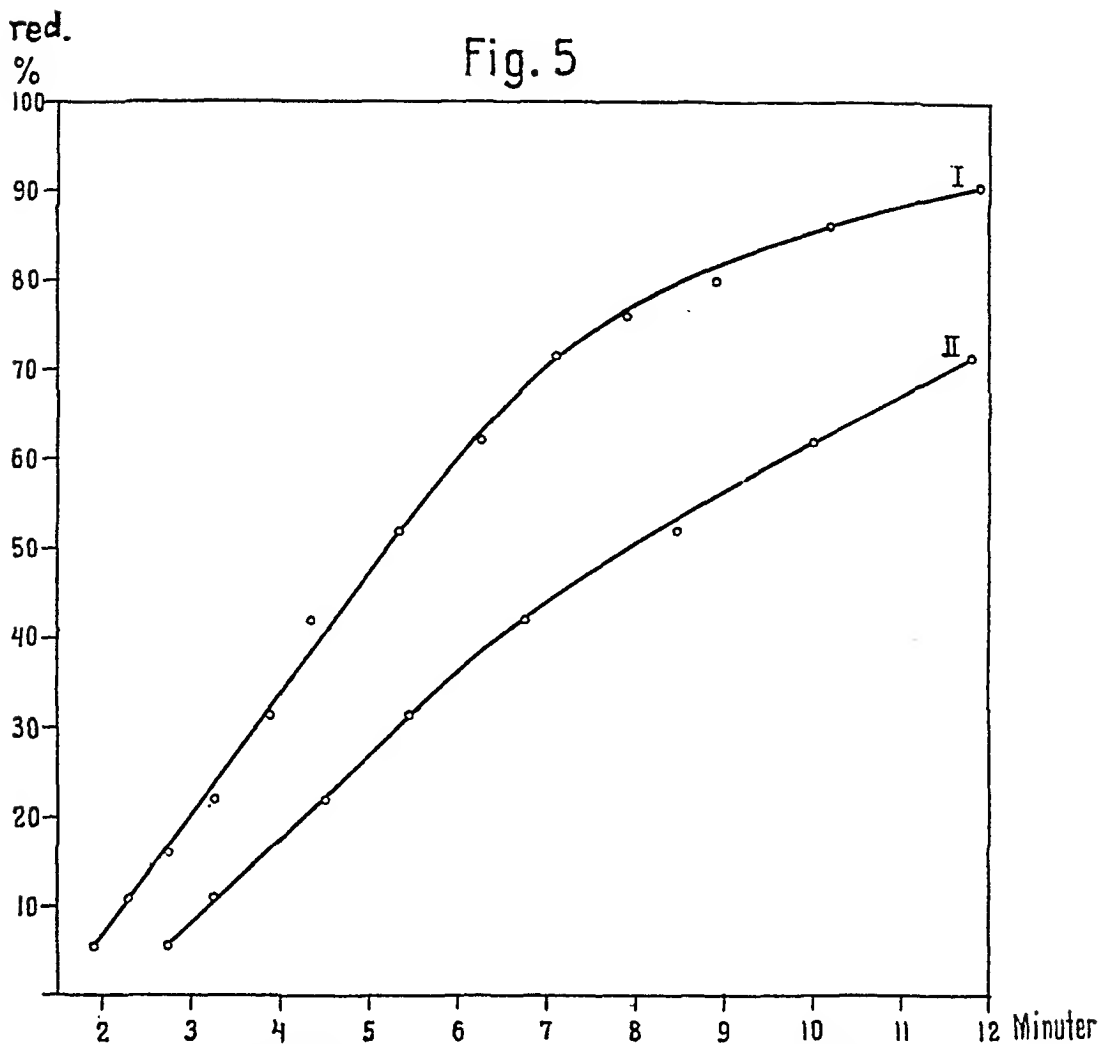


Fig. 5. Bs-Dehydrierung bei pH 7,18 % reduziertes Methylenblau.

I ohne Malonat. II mit Malonat.

Grad der Hemmung X %.

$$\frac{X \cdot 1}{100 \cdot b} = b - \frac{1}{m} = \frac{m - b}{bm}; \quad X = \frac{100(m - b)}{m}$$

Die Malonathemmung der Succinodehydrogenase bei dem angegebenen Versuch wird dann berechnet. Aus Fig. 5. u. 6. ergibt sich folgendes: *Bs-Dehydrierung*. A (20 %) = 3,00 Minuten. B (58 %) = 5,80 Minuten. B—A = 2,80.

A' (80 %) = 4,25 Minuten. B' (42 %) = 9,35 Minuten. B'—A' = 5,10.

Die *Bs-Dehydrierung* wird von Malonat um 45 % gehemmt. Die entsprechenden Werte der *Fumarsäurehydrierung* sind:

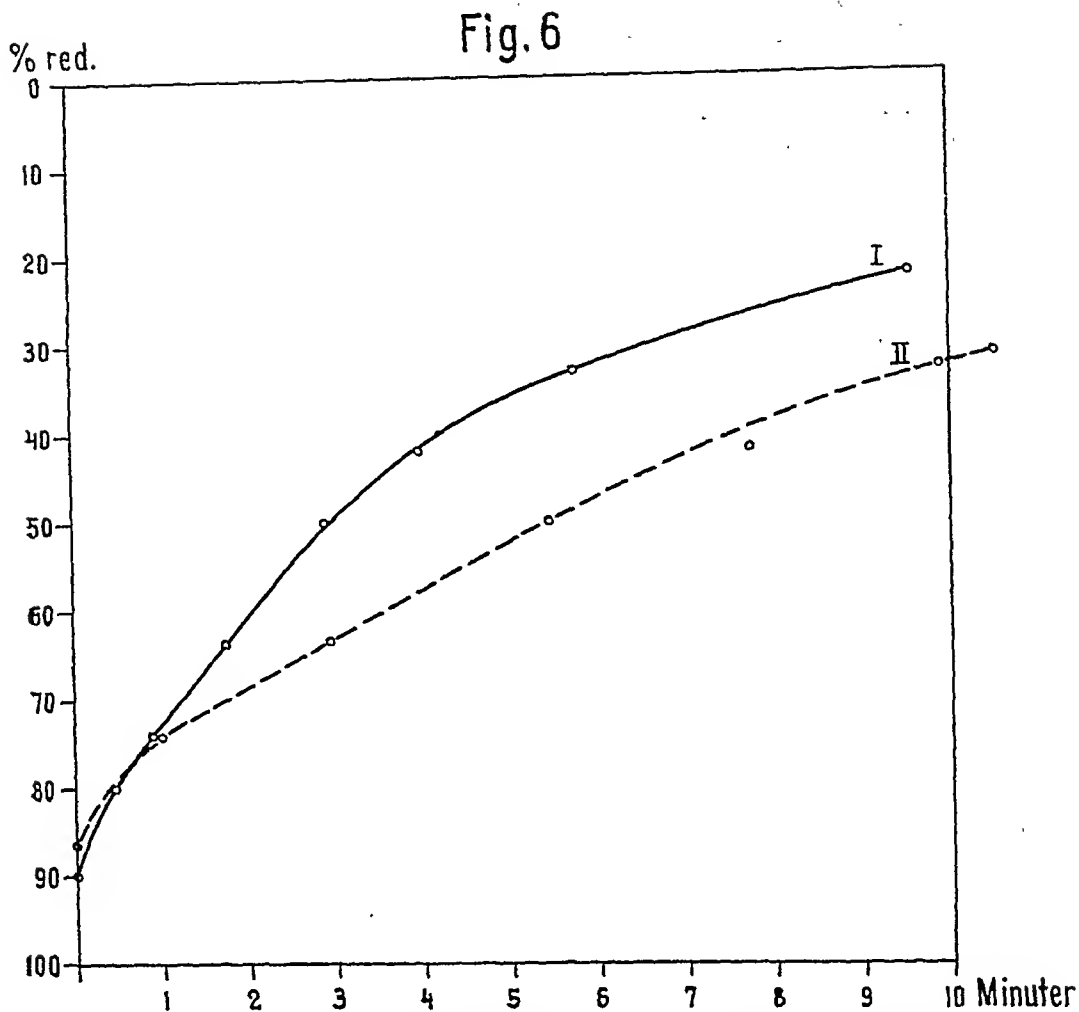


Fig. 6. Fumarsäurehydrirung bei pH 7,18. % reduziertes Methylenblau.  
I ohne Malonat. II mit Malonat.

A (80 %) = 0,45 Minuten. B (42 %) = 4,00 Minuten. B—A = 3,55.

A' (80 %) = 0,45 Minuten. B' (42 %) = 7,50 Minuten. B'—A' = 7,05.

Die Fumarsäurehydrirung wird von Malonat um 50 % gehemmt.

Diese Versuch wurde bei pH 7,18 ausgeführt.

Eine Versuchsserie wie oben wurde auch bei pH 7,02 ausgeführt. Das Ergebnis war, dass die *Bs-Dehydrirung* bei der verwendeten Malonatkonzentration um 45 % und die Fumarsäurehydrirung um 51 % gehemmt wurden. Bei diesem Ver-

such wurde die Malonathemmung aus der Umsetzung von 29 % bis 60 % (bzw. 71 % bis 40 % berechnet.)

*Die obigen Versuche zeigen also, dass (innerhalb der Fehlergrenzen) die Malonsäure eine ungefähr gleich starke Hemmung auf Bs-Dehydrierung und Fumarsäurehydrierung ausübt.*

---

## KAPITEL IV.

# Beitrag zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen der Bs.

**B**isher liegen nur wenige Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen der Bs vor. Bs ist giftig nur bei Einverleibung sehr grosser Mengen (HEYMANS 1889; siehe auch die Literatur über die Bs-Elimination in vivo, S. 3). SALANT, MITCHELL und SCHWARTZE (1917) zeigen, dass „starke und mittelstarke“ Succinatkonzentrationen (siehe unten) *Darntonus* und *-bewegungen* anregen. Am stärksten ist diese Wirkung bei Ileum und Jejunum. Bewegungen und Tonus des Rektum hingegen werden durch Succinat leicht gehemmt. (Kaninchendarm in Lockes Lösung, n/10 hinsichtlich des Succinats.) SALANT, LIVINGSTON und CONNET (1917) zeigen, dass die Stärke der *Kontraktionen isolierten Froschherzens* durch Succinat unbedeutend eingeschränkt wird, während die Frequenz unbeeinflusst bleibt. (Froschherz nach Straub in Lockes Lösung, n/50 oder n/25 in bezug auf das Succinat.) Ausserdem betonen die genannten Autoren, dass die Toxizität der Bs durch die Einführung von Hydroxylgruppen (Apfelsäure, Weinsäure) stark gesteigert wird. In einer Arbeit über den Einfluss verschiedener Dikarbonsäuren auf die *Nierenfunktion* hat ROSE (1925) gezeigt, dass Bs die Nierentätigkeit nicht beeinflusst (4 g Bs als Natriumsuccinat subcutan injiziert; Versuchstier Kaninchen).

Es gilt die passende Bs-Dosierung für Untersuchung der Bs-Umsetzung in vivo festzustellen. Für diese Untersuchung ist es wünschenswert zu wissen, welche pharmakologischen Wirkungen die Einverleibung von Bs hervorruft und bei welchen Gaben diese Wirkungen sich zeigen. Hiervon ausgehend, ermittelt man dann die Bs-Menge, die einverleibt werden kann, ohne dass sich störende pharmakologische Wirkungen ergeben.

Nach den referierten Versuchen ist ein pharmakologischer Effekt erst bei Zufuhr sehr grosser Mengen Bs zu erwarten. Der Darm wird etwas beeinflusst, wenn die Succinatkonzentration der umgebenden Lösungen n/10 beträgt. Diese Konzentration ist weit höher als diejenigen, die bei Untersuchungen des Bs-

Stoffwechsels in vivo vorkommen können. Eine Untersuchung des Einflusses der Bs auf den Darm in vivo dürfte sich daher erübrigen. — Dagegen wird der Herzmuskel durch schwächere Succinatkonzentrationen ( $n/25$ — $n/50$ ) beeinflusst. Auch diese Konzentrationen dürften jedoch in Stoffwechselversuchen nicht erreicht werden. Es kann indessen angezeigt sein, die Reaktion des Kreislaufapparates bei Einverleibung von Bs zu untersuchen, und zwar um so mehr, als in Vorversuchen bei intravenöser Injektion von Natriumsuccinat verstärkte Atmung festgestellt wurde.

*Methodik:* Die Atmung wurde durch eine in die Trachea eingelegte Y-Röhre registriert, deren einer Schenkel an eine Mareysche Kapsel angeschlossen war. Der Druck im rechten Vorhof wurde durch eine lange Glaskanüle registriert, die aus der V. jugularis in den rechten Vorhof hinabgeführt wird. Diese Kanüle wird mit einem Wassermanometer mit Schwimmer verbunden. Der arterielle Druck wurde in der Regel mittels einer T-Kanüle in der Art. femoralis gemessen, die an ein Membranmanometer angeschlossen wurde. Antikoagulans: Benzoechtrosa, das bekanntlich den Kreislauf nicht beeinflusst (KAHLSON u. LANDBY 1938). Versuchstiere: Hunde und Kaninchen.

Bei Versuchen an *Hunden* mit Messung des Arterien- und Vorhofdrucks rief intravenöse Einverleibung von Bs Einschränkung der Herztätigkeit mit gesteigertem Vorhofdruck und geschwächtem Arteriendruck hervor. Die Bs-Menge, die zur Erzielung dieser Wirkung notwendig war, wechselte stark, vermutlich wegen der Heterogenität des Tiermaterials. Da es unmöglich war, hier ein homogenes Tiermaterial zu erhalten, ging ich dazu über, mit *Kaninchen* zu arbeiten.

Bei intravenöser Injektion von 80—90 ml Natriumsuccinat (2,6 %ig) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min. vergrösserte sich die Atmungsamplitude, während die Atmungsfrequenz nur wenig, der Vorhofdruck und der arterielle Druck gar nicht beeinflusst wurden. In wiederholten Versuchen wurde festgestellt, dass intravenöse Injektion von 20 ml/kg Körpergewicht dieser Succinatlösung mit derselben Geschwindigkeit die Herztätigkeit unbeeinflusst liess (durch Arteriendruck und Vorhofdruck gemessen). Die leichte Senkung des Vorhofdrucks während der Succinatinjektion in einigen Versuchen dürfte auf der verstärkten Atmung beruhen.

Ausserdem wurde die Bs-Menge ermittelt, die zugeführt werden muss, damit die Herztätigkeit beeinflusst (eingeschränkt)

wird (s. Fig. 7). Hierzu waren erforderlich 20—40 ml pro kg Körpergewicht einer 9,6 %igen Natriumsuccinatlösung, die intravenös mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 ml/Min. einverleibt wurden.

Aus Obigem geht hervor, dass intravenöse Injektion von 0,52 g Natriumsuccinat pro kg Körpergewicht (=0,33 g Bs) in 2,6 %iger Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min. keine Schwächung der Herztätigkeit verursacht. Intravenöse Zufuhr dieser

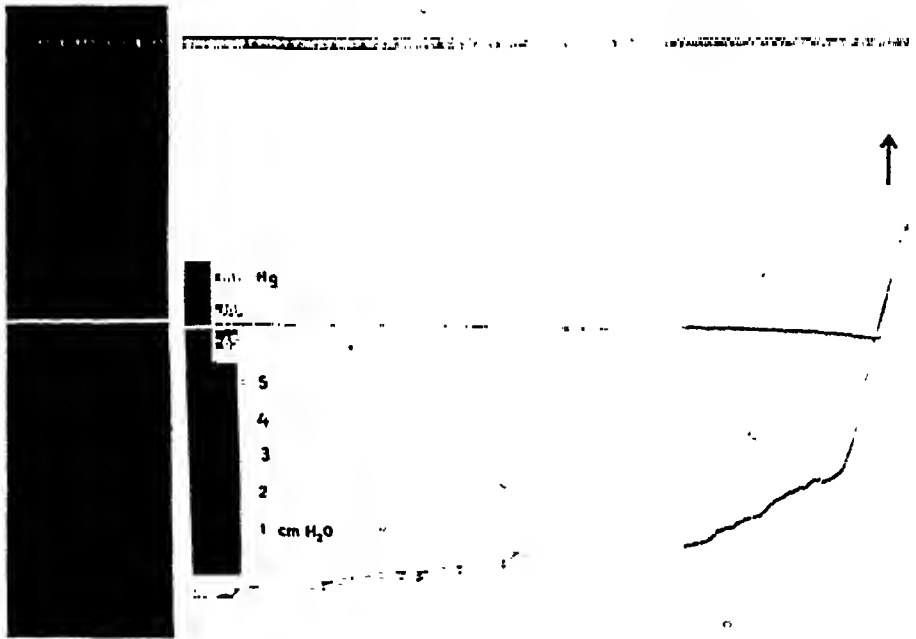


Fig. 7. Kaninchen in Urethan-Narkose. Von oben nach unten: Zeit jede 5. Sekunde, Blutdruck der Art. femoralis. Druck im rechten Vorhof. Der linke Teil der Fig. zeigt die normalen Verhältnisse vor der Succinatinjektion, der rechte Teil während intravenöser Succinatinjektion. Bei dem Pfeil wurde die Injektion abgebrochen. 60 ml 9,6%ige Lösung von Natriumsuccinat injiziert während 55 Min.

oder einer kleineren Menge Bs dürfte daher ohne nachteilige Folgen zur Untersuchung des Bs-Stoffwechsels in vivo angewandt werden können. — Eine Schwächung der Herzfunktion zeigt sich erst bei intravenöser Injektion von 1,9—3,8 g Natriumsuccinat pro kg Körpergewicht (=1,4—2,8 g Bs) in 9,6 %iger Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min.

Die relativ grosse zugeführte Flüssigkeitsmenge ist ohne Bedeutung für diese Beeinflussung der Herztätigkeit durch Bs. So wurde z. B. in dem in

Fig. 7 wiedergegebenen Versuch eine erheblich geringere Flüssigkeitsmenge injiziert als in den Versuehen mit 2,6%iger Succinatlösung. — Die stärkere Bs-Lösung ist hypertonisch. Dies dürfte indessen für die gefundene Wirkung ohne wesentliche Bedeutung sein.

Die geschilderten Versuche sagen nichts über die Ursache dieser Bs-Wirkung auf das Herz. Es lassen sich diesbezüglich mehrere Hypothesen aufstellen, doch liegt diese Frage ausserhalb des Rahmens meiner Untersuchung, weshalb ich sie offen lasse.

*Intravenöse Injektion von Bs (als Natriumsuccinat) bewirkt in kleinerer Dosis (0,38 g Bs/kg Körpergewicht mit 0,016 g Bs/Min.) eine leichte Vertiefung der Atmung, ohne den Kreislauf zu beeinflussen. Grössere Dosen (1,4—2,8 g Bs/kg Körpergewicht mit 0,07—0,14 g Bs/Min.) schwächen die Herzleistung.*

---

## KAPITEL V.

# Die Umsetzung der Bernsteinsäure in vivo.

### Literaturübersicht und Anlage der Untersuchung.

**Z**ugeführte Bs wird in vivo praktisch vollständig eliminiert (Literatur siehe S. 3). Bei diesen Versuchen, die grösstenteils in der Absicht ausgeführt wurden, den Gang des Abbaus der Fettsäuren zu ermitteln, ist Bs per os oder durch subcutane Injektion einverleibt worden. Der Harn wurde dann auf das Vorkommen von Bs und auch auf andere Metaboliten untersucht. In einigen Fällen, wo die Bs peroral verabfolgt worden war, hat man durch Bs-Analysen der Faeces kontrolliert, dass die zugeführte Bs wirklich resorbiert worden war. Diese Eliminationsversuche sind an Ratten, Hunden und Menschen ausgeführt worden. KREBS, SALVIN u. JOHNSON (1938) haben Kaninchen grosse Dosen Succinat intravenös eingespritzt und dann im Harn ein Drittel der injizierten Menge Bs wiedergefunden. In diesem Falle ging die schnelle Einverleibung der Bs wahrscheinlich über das Vermögen des Organismus, Bs zu eliminieren. Dies hatte zur Folge, dass eine verhältnismässig grosse Menge Bs wieder ausgeschieden wurde. Bei der langsamen Resorption von Bs nach Einverleibung per os oder durch subcutane Injektion kann der Organismus alle zugeführte Bs umsetzen.

Über die *Bs-Bildung in vivo* liegen nur wenige Mitteilungen vor. Perfundierte Leber kann nach Zusatz von Arginin Bs bilden (FELIX, zitiert nach LEHNARTZT 1937). Unter ähnlichen Versuchsbedingungen, obwohl technisch unbefriedigend (siehe S. 7), haben TOENNISSEN u. BRINKMANN (1930) Bs-Bildung nach Zusatz von Brenztraubensäure nachgewiesen.

Sowohl die Eliminationsversuche als die Experimente zum Nachweis der Bildung von Bs sind als Belastungsversuche durchgeführt worden. Es wurde also ein Stoff in grosser Menge einverleibt und seine Elimination bzw. seine Fähigkeit, Bs zu bilden, untersucht. Solche Versuche sagen nichts darüber aus, ob die untersuchte Reaktion normal wirklich stattfindet, und wenn, in welchem Umfang dies geschieht. Die einzigen Tatsachen, die darauf hindeuten, dass eine *Bs-Umsetzung normal in vivo vor sich geht*, sind einmal das normale Vorhandensein kleiner Mengen Bs im Gewebe und im Harn (KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938, KRUSIUS



1940), zum andern der Umstand, dass diese Bs-Ausscheidung nach paren-teraler Zufuhr von Malonsäure zunimmt (KREBS et. al., 1938).

Ausserdem hat man untersucht, wie Zuführung von Bs in vivo gewisse andere Stoffe beeinflusst. Die *Citronensäureausscheidung* mit dem Harn wird durch Zufuhr von Bs gesteigert (ORTEN-SMITH 1937; Literatur bei MÄRTENSSON 1940, KRUSIUS 1940). — Der *Glykogengehalt der Leber* steigt nach Zuführung von Bs, nicht aber der übrigen gesättigten Dikarbonsäuren von der Malonsäure bis zur Sebacinsäure. Fumarsäure, Apfelsäure und Oxallessigsäure haben dieselbe Wirkung wie Bs (PONSFORD u. SMEDLEY-MACLEAN 1932, MAJER u. REISNER 1933, STÖHR 1933, 1938). Die Ausscheidung von Glykose bei phlorizinvergifteten Hunden steigt nach Verabfolgung von Bs an (RINCER, FRANKÉL u. JONAS 1913). Diese Autoren sind auf Grund ihrer Ergebnisse der Ansicht, Bs könne Glykose bilden und stelle hier ein Intermediärprodukt bei der Umsetzung von Glutaminsäure, Arginin, Ornitin und Prolin dar. Die Zuführung von Bs bei Leberperfusion ruft eine Steigerung des Blutzuckers hervor (BLIXENKRONE-MÖLLER 1938). Der Verfasser hat indessen nicht kontrolliert, ob einer der möglicherweise bei der Bs-Umsetzung gebildeten Metaboliten (z. B. Fumarsäure) etwa die Blutzuckerbestimmung stören kann. — Die Einverleibung von Natriumsuccinat per os bewirkt eine starke *Alkalose* (BECKER-FREYSENG u. LIEMICH 1938). — Wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, ist die Umwandlung der Bs in vivo wenig erforscht.

Will man die normale Umsetzung der Bernsteinsäure kennenlernen, so muss teils die Bs-Elimination, teils die Bs-Bildung erforscht werden. Die *Untersuchung der Bs-Elimination* umfasst die Bestätigung der oben referierten Versuchsergebnisse, dass Bs eliminiert wird, worauf die Geschwindigkeit dieser Elimination festgestellt wird. Ferner wird untersucht, ob diese Fähigkeit, Bs zu eliminieren, eine Fähigkeit sämtlicher Gewebe oder nur gewisser Organe ist. Die *Untersuchung der Bs-Bildung* stellt sich folgende Fragen: Erfolgt normal eine Bs-Bildung? Ist eine etwaige Fähigkeit, Bs zu bilden, nur an gewisse Organe gebunden oder besitzen sämtliche Gewebe des Körpers diese Fähigkeit?

### Methodik.

Versuchstiere: in der Regel Kaninchen, in einigen Fällen Katzen. Narkosemittel: Urethan, 1 g pro kg Körpergewicht subcutan, während der Operation Äther. Antikoagulans: Heparin Vitrum. Arterielle Blutproben wurden der Art. femoralis oder der Art. carotis entnommen. Venenblutproben aus verschiedenen Organen wurden mit der Injektionsspritze nach Punktion der freigelegten Vene entnommen. Die Bs wurde mittels intravenöser

Injektion in eine Ohrenvene oder die V. femoralis einverleibt. Zur Injektion wurde eine Natriumsuccinatlösung, hauptsächlich 0,133-mol., verwendet, die aus Acid. succin. Merck pro analysi und der äquivalenten Menge Natronlauge bereitet war. Die Malonsäure wurde intravenös einverleibt, und zwar in Form einer aus Acid. malon. Merck und der äquivalenten Menge Natronlauge bereiteten Natriummalonatlösung.

Bei Perfusion isolierter Organe habe ich die von LUNDSGAARD ausgearbeitete Technik angewandt, ungefähr wie sie von BLIXENKRONE-MÖLLER (1938) beschrieben worden ist. Heparinblut wurde unverdünnt gebraucht. Der Perfusionsapparat wird mit dem Blute von 1—2 Kaninehen gefüllt. Der Aderlass dieser Kaninehen muss schnell erfolgen, denn sonst steigt die Bs-Konzentration des Blutes (siehe hierüber S. 99). Aus demselben Grunde kann man die Tiere nicht mit Kochsalz durchspülen, um möglichst viel Blut zu erhalten. Die Versuchstiere wurden aus der Art. carotis zur Ader gelassen. Nach dem Ingangsetzen der Perfusion liess ich eine „Stabilisierungsperiode“ von etwa 20 Minuten verfließen, bevor ich mit dem Versuch begann. — Bei Leberperfusion kann der gefüllte Magen selbst-digerieren, wobei er leicht nach rückwärts-aufwärts gegen die untere Leberfläche hin platzt (siehe MARTENSSON 1940, S. 46). Dies vermeidet man, indem man durch einen kleinen Einschnitt in die grosse Krümmung den grösseren Teil des Mageninhaltes entleert. Ich habe dieses Verfahren dem Fastenlassen der Tiere vorgezogen, da beim Fasten der Glykogengehalt der Leber abnimmt.

### Normalwerte.

Eine notwendige Voraussetzung dieser Untersuchung ist die Kenntnis der Bs-Konzentration in arteriellem Blut, im Venenblut verschiedener Organe und im Harn. Die Bs-Ausscheidung mit dem Harn beläuft sich beim Kaninchen auf 20—30 Mikromol pro Tag (KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938); nach KRUSIUS (1940, S. 143) beträgt sie 20,8 mg pro 24 Stunden. Der normale Bs-Gehalt des menschlichen Blutserums ist 6—7  $\gamma$ /ml, der des Liquor cerebrospinalis 3—4  $\gamma$ /ml (THUNBERG 1938).

Diese Angaben werden durch Tabelle 21 ergänzt. Mittelwert aus diesen 30 Bs-Bestimmungen im Blut der Art. carotis ist 4,2  $\gamma$  Bs/ml Plasma. Zur Technik der Probenentnahme siehe S. 84.

Es sei bemerkt, dass die Ergebnisse der Bs-Bestimmung im Plasma unsicher sind, da die Werte an der unteren Grenze der Methode liegen.

TABELLE 21.

γ Bs pro ml Plasma im Blut der					
Art. carotis	V. jugularis	V. femoralis	V. renalis	V. porta	V. hepatica
7	7	7	—	—	—
1	3	—	0	—	—
0	0	—	1	—	—
0	0	0	0	—	—
7	—	—	—	25	20
12	—	—	—	14	14
3	—	—	—	24	26
22	—	—	—	26	29
0	—	—	—	—	—
8					
2					
1					
6					
12					
0					
6					
6					
7					
1					
3					
2					
2					
2					
0					
0					
6					
5					
0					
0					
5					

### Elimination der Bs beim ganzen Tier.

Zuerst musste festgestellt werden, mit welcher Geschwindigkeit intravenös einverleibte Bs aus dem Blute eliminiert wird. Gleichzeitig war zu kontrollieren, dass die Elimination nicht eine Ausscheidung mit dem Harn ist.

Figur 8, S. 87, zeigt einige Beispiele solcher Eliminationsversuche.

Wie die Versuche zeigen, wird zugeführte Bs schnell aus der

Fig. 8

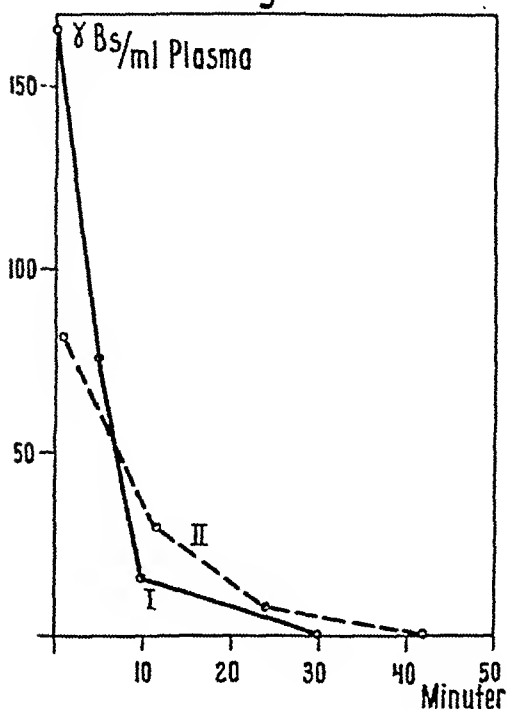


Fig. 8. Bs-Elimination beim ganzen Tier.

I. Kaninchen in Urethan-Narkose. 27,2 mg Bs pro kg Körpergewicht, intravenös während 3 Minuten injiziert. Im Harn werden 2,2 % der injizierten Bs-Menge wiedergefunden.

II. Kaninchen nicht narkotisiert. 25,2 mg Bs pro Körpergewicht, intravenös während 3 Minuten injiziert.

*Blutbahn eliminiert.* Nur ein kleiner Teil der zugeführten Bs wird mit dem Harn ausgeschieden (weniger als 5 %). Dies steht in gutem Einklang mit den Befunden anderer Autoren. Meine Versuche zeigen ausserdem, dass die Bs-Elimination nur wenig durch die angewandte Narkose beeinflusst wird. Der geringfügige Einfluss der Narkose auf die Elimination der Bs macht es *wahrscheinlich*, dass die übrigen Versuche, die an Tieren in dieser Narkose gemacht worden sind, die normale Bs-Umsetzung anzeigen.

#### Die Bs-Elimination verschiedener Organe.

Während der Elimination zugeführter Bs ist der Bs-Gehalt des Venenblutes verschiedener Organe sowie arteriellen Blutes bestimmt worden. Indem man so die „arterio-venöse Differenz“ der einzelnen Organe feststellt, gewinnt man ein Bild von der Fähigkeit dieser Organe, Bs zu eliminieren.

Aus praktischen Gründen kann sich eine erste Untersuchung nur auf wenige Organe des Körpers erstrecken. Die Organe, die nach der bisherigen einschlägigen Literatur (siehe v. EULER 1934, S. 512, BREUSCH 1937 a) am meisten Succinodehydrogenase enthalten, sind Muskel, Herz, Niere, Leber und Hirn. Herz und Leber lassen sich aus technischen Gründen mit dieser Methode schlecht untersuchen. Die Untersuchung der arterio-venösen Differenzen bei der Bs-Elimination umfasst daher nur Muskel, Hirn und Niere. Aus praktischen Gründen ist es schwierig, alle Organe auf ihre Fähigkeit, Bs zu eliminieren, zu untersuchen. Es werden daher mit wechselnder Technik nur gewisse Gruppen untersucht, bis man für ein oder einige Organe eine Bs-Elimination feststellt, die derjenigen des ganzen Tieres entspricht.

Um eine möglichst konstante Eliminationsgeschwindigkeit während des Versuches zu erzielen, wurde die Bs durch intravenöse Injektion mit konstanter Injektionsgeschwindigkeit während der ganzen Versuchsdauer (mit dem Infusionsapparat) zugeführt. Die Blutproben wurden erst einige Zeit (etwa 15 Min.) nach Beginn der Injektion entnommen, damit sich die Bs-Konzentration im Organismus inzwischen ausgleichen konnte. Die Dauer des Konzentrationsausgleichs ist nicht experimentell festgestellt. Bei Versuchen mit verschieden langer Zeit für diesen Ausgleich haben wir indessen im Prinzip dasselbe Ergebnis erhalten. — Die venösen und arteriellen Blutproben wurden nach Möglichkeit gleichzeitig entnommen, zur Technik siehe S. 84.

Die Tabellen 22 und 23 verzeichnen die Ergebnisse solcher Versuche.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das *Nierengewebe zugeführte Bs mit weit grösserer Geschwindigkeit eliminieren kann als die übrigen untersuchten Gewebe.*

TABELLE 22.

Art. carotis	γ Bs pro ml Plasma im Blut der		V. femoralis
	V. jugularis	Art. carotis	
359	334	376	311
272	224	349	265
75	71	108	85
		85	75
		70	61
		70	67 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Blutprobe nach 23 Minuten Succinatinjektion genommen.

TABELLE 23.

γ Bs pro ml Plasma im Blut der	
Art. carotis	V. renalis
383 <sup>1</sup>	101 <sup>2</sup>
233	80
296	92
160	35
132	24
127	19
59	5
46	0

Wenn die zugeführte Bs aus der Blutbahn verschwindet, so kann diese Elimination auf zwei Faktoren beruhen. Zuerst *diffundiert die Bs aus dem Blute in die Gewebe*, bis der Konzentrationsausgleich erfolgt ist. Darauf *setzen die Gewebe evtl. Bs um*. Erfolgt die Bs-Umsetzung in den Geweben schnell, so wird dadurch die Diffusionsgeschwindigkeit beschleunigt, da die Bs-Konzentration der Gewebe ständig niedrig bleibt.

Ein Unterschied zwischen dem Bs-Gehalt des arteriellen und des venösen Blutes während der Zuführung von Bs kann andeuten, dass in dem fraglichen Organ Bs umgesetzt wird. Doch kann er auch darauf zurückzuführen sein, dass der Konzentrationsausgleich zwischen Blut und Gewebe noch nicht vollzogen ist.

Wie soll man wissen, ob die obigen Ergebnisse eine Umsetzung anzeigen oder nicht? Wie oben bemerkt wurde, ist die bei den Versuchen für den Konzentrationsausgleich benötigte Zeit nicht experimentell festgestellt. Eine solche Feststellung ist technisch sehr schwierig, da eine derartige Untersuchung, soll sie wirklich zufriedenstellende Ergebnisse liefern, schnelle, zuverlässige Gewebsanalysen umfassen muss. Man kann aber statt dessen die Bs-Elimination isolierter Organe in Perfusionsversuchen studieren. Bei Zusatz von Bs lässt sich die Konzentration der Bs im Blute nach vollständigem Konzentrationsausgleich zwischen dem Blute und dem fraglichen Organ grob berechnen. Sinkt die Bs-Konzentration des Blutes während des Versuchs unter den berechneten Wert ab, so ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Umsetzung von Bs stattgefunden hat. *Natürlich sind aber solche Berechnungen unsicher.*

<sup>1</sup> Bs nach Elimination von α-Ketoglutarinsäure bestimmt: 483 γ Bs/ml Plasma.

<sup>2</sup> Bs nach Elimination von α-Ketoglutarinsäure bestimmt: 161 γ Bs/ml Plasma.

TABELLE 24.

	γ Bs/ml Plasma
Normalwert .....	0
Venenblut 90 Minuten nach der Bs-Zufuhr .....	82 <sup>1</sup>
Arterienblut 90 Minuten nach der Bs-Zufuhr .....	88 <sup>1</sup>

Kaninchen, 3,0 kg, Perfusion des Hinterkörpers. Urelhan 1 g/kg. Gewicht des Hinterkörpers 1,0 kg. Perfusionsflüssigkeit 175 ml Heparinblut. Zusatz von 31,2 mg Bs zum Blut.

Die Bs verteilt sich vermutlich nicht gleichmässig über das Hinterkörperpräparat. Für gewisse Gewebe, so Knochen- und Knorpelgewebe, dürfte die Diffusion äusserst gering sein. BLIXENKRONE-MÖLLER (1938) gibt an, ein Hinterkörperpräparat bestehe zu etwa 50 % aus Muskeln. Legen wir diese Zahl zugrunde, so würde sich in unserem Fall die zugesetzte Bs auf 500 g Gewebe + 175 ml Blut verteilen, was 46,2 γ Bs/g Gewebe entspricht. Bei Abschluss des Versuchs war die Bs-Konzentration des Venenblutes 82 γ/ml Plasma.

Aus diesem Versuch lässt sich nicht entscheiden, ob die Muskulatur<sup>2</sup> langsam Bs umsetzen kann oder nicht. Die arteriovenöse Differenz ist auch zu klein, um diese Frage beantworten.

Ähnliche Perfusionsversuche wurden mit Leber gemacht. Hier sinkt auch die Bs-Konzentration des Blutes nach Zuführung von Bs so langsam, dass der „Ausgleichwert“ im Laufe des Versuchs nicht erreicht wurde. Die Versuchsdauer darf bei Perfusionen nicht über 2 Stunden betragen (BLIXENKRONE-MÖLLER 1938). Mit dieser Methodik lässt sich also nicht entscheiden, ob die Leber eine geringe Fähigkeit besitzt, intravenös eingegebene Bs umzusetzen oder nicht. —

Bei Versuchen mit von der Leber gebildeter Bs ist die Eliminationsfähigkeit dieses Organs äusserst gering. Vermindert man bei Perfusionsversuchen mit Leber die Sauerstoffzufuhr, so steigt der Bs-Gehalt des Perfusionsblutes. Dabei muss ja auch der Bs-Gehalt des Gewebes gestiegen sein. Untersucht man hier die Bs-Konzentration des Perfusionsblutes, so findet man ein äusserst langsames Absinken.

<sup>1</sup> Bs nach Elimination von α-Ketoglutarinsäure bestimmt.

<sup>2</sup> Hier wird von „Muskulatur“ gesprochen, doch können natürlich auch andere Gewebe bei der Elimination der Bs eine gewisse Rolle spielen, wahrscheinlich jedoch ist diese von untergeordneter Bedeutung.

TABELLE 25.

Zeit in Minuten nach Beginn des Perfusionsversuches	γ Bs/ml Plasma	
	Venenblut	Arterienblut
30	63	53
55	58	56
90	55	48
115	43	43

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, nach Elimination von  $\alpha$ -Ketoglutarensäure.

In Hinsicht auf den Fehler der Bs-Bestimmung ist die Bs-Eliminierung der Leber hierdurch nur wahrscheinlich gemacht, nicht sichergestellt. *Die Leber kann also wahrscheinlich Bs mit geringer Geschwindigkeit umsetzen.*

Nach den arterio-venösen Differenzen zu urteilen, dürfte die Eliminationsfähigkeit des Gehirns derjenigen der Muskulatur vergleichbar sein. Bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die analysierte Blutprobe nicht nur Blut aus dem Gehirn, sondern auch aus anderen Geweben des Kopfes, so der Muskulatur, enthält. Da die Untersuchung des Gehirns mittels Perfusion besondere technische Vorrichtungen erfordert, und da ausserdem die etwaige Eliminationsfähigkeit des Hirns für den Organismus quantitativ von geringerer Bedeutung ist (ebenso wie die der Muskulatur und der Leber), ist sie hier nicht näher untersucht worden.

Das Organ, das nach Ausweis der arterio-venösen Differenzen die grösste Eliminationsfähigkeit hat, ist die Niere. In diesem Fall kann das Ergebnis ausser auf einer Diffusion der Bs aus dem Blut in Gewebe auch auf einer Ausscheidung von Bs mit dem Harn beruhen. Harnanalysen haben gezeigt, dass die Wegschaffung zugeführter Bs mit dem Harn geringfügig ist, weniger als 5 % der injizierten Menge. Die grosse arterio-venöse Differenz kann also nicht dadurch bedingt sein. Theoretisch ist es möglich, dass eine schnelle Diffusion in die Gewebe eine solche Differenz verursachen könnte. Doch müsste durch eine so schnelle Diffusion sich der Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Gewebe schnell ausgleichen. Was die Muskulatur betrifft, so erfolgt der Konzentrationsausgleich verhältnismässig langsam. Aber die arterio-venöse Differenz für Muskulatur ist doch bei weniger als 100 γ Bs/ml Plasma im arteriellen Blut nach einer Injektionsdauer von etwa 20 Minuten an-



nähernd ausgeglichen (siehe Tabelle 22). Es ist also *wahrscheinlich, dass die Nieren Bs umsetzen*. Es ist möglich, dass die Nieren in Anbetracht ihrer geringen Masse trotz ihrer grossen Fähigkeit, Bs schnell zu eliminieren, für die Bs-Elimination des Organismus nicht so wesentlich sind, wie z. B. die Muskulatur mit ihrer langsamen Elimination, dafür aber grossen Masse. Um die Bedeutung der Nieren für die Bs-Elimination des Organismus in Erfahrung zu bringen, wurden Eliminationsversuche sofort nach Exstirpation der Nieren gemacht.

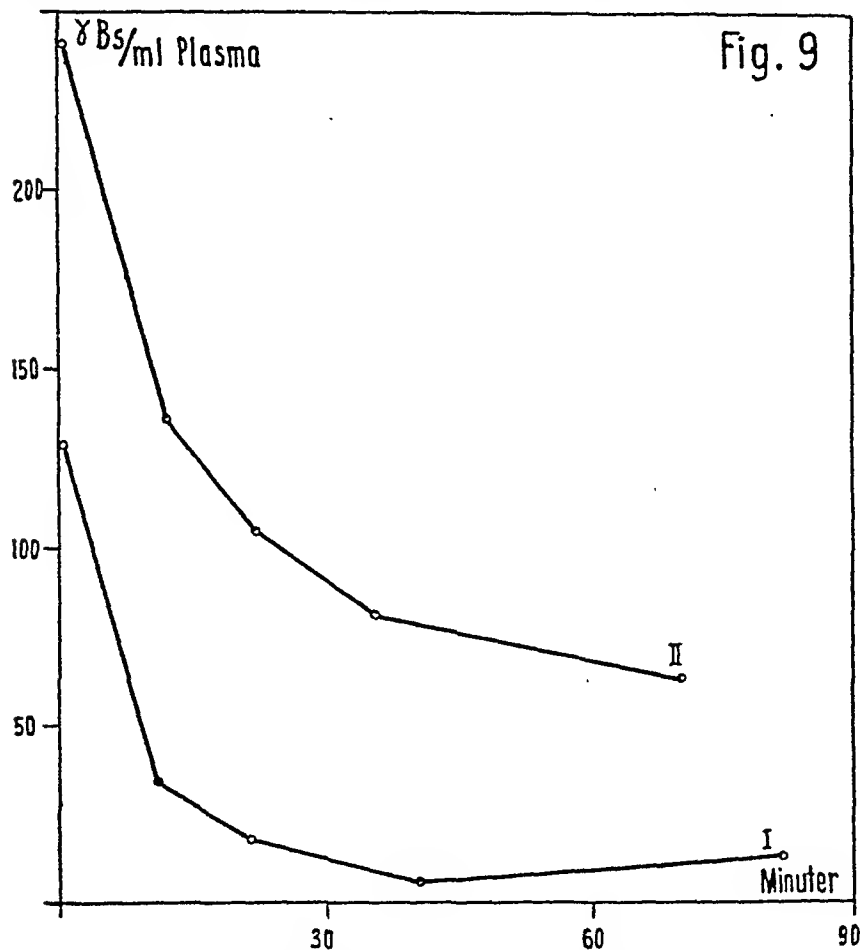


Fig. 9. Bs-Elimination nach Nierenexstirpation.

Kaninchen in Urethan-Narkose. Bs intravenös injiziert während 3 Minuten.

I. (Zum Vergleich angegeben.) Ohne Nierenexstirpation. 58,3 mg Bs pro kg Körpergewicht injiziert.

II. 30 Minuten nach Nierenexstirpation 68,4 mg Bs pro kg Körpergewicht injiziert.

Narkose wie oben S. 84. Bauchschnitt. Nierenexstirpation, nachdem Gefässe und Ureteren unterbunden worden sind, worauf der Bauch mit Péans verschlossen wird. Sobald wie möglich nach der Nierenexstirpation wird Bs in die V. femoralis injiziert (Technik wie oben S. 84 angegeben). Die nachstehende Kurve zeigt die Ergebnisse eines solchen Versuches, denen zum Vergleich auch eine normale Eliminationskurve beigefügt ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Nieren von vorherrschender Bedeutung für die Bs-Elimination des ganzen Organismus sind. Ausserdem sind diese Ergebnisse ein neuer Beweis dafür, dass die Elimination der Bs in den Nieren auf einer wirklichen Umsetzung im Nierengewebe beruht. Die Harnausscheidung beläuft sich, wie schon erwähnt, auf höchstens 5 % der injizierten Menge. Wenn die Elimination seitens der Nieren nur auf einer Ausscheidung der Bs mit dem Harn beruhte, so müsste eine Vermehrung der injizierten Menge um 5 % bei normalen Kaninchen eine Eliminationskurve vom selben Typus ergeben, wie man sie hier nach der Nierenexstirpation sieht.

Nierenexstirpation ohne Zuführung von Bs beeinflusst die normale Bs-Konzentration des Blutes nicht oder nur äusserst wenig (siehe hierüber S. 95).

Die grosse Bedeutung der Nierengewebe für die Bs-Umsetzung im Organismus tritt noch deutlicher hervor, wenn die Bs-Bestimmungen erst nach der Eliminierung der  $\alpha$ -Ketoglutar-säure ausgeführt werden (siehe nachstehende Tabelle).

TABELLE 26.

Bs-Elimination von Normalen Kaninchen		Bs-Elimination von Kaninchen nach Nierenexstirpation	
Zeit in Minuten nach der Bs-Zufuhr	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut	Zeit in Minuten nach der Bs-Zufuhr	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut
Normalwert	7	$\frac{1}{2}$	608
$\frac{1}{2}$	267	16	271
12	36	30	199
33	18	45	197
63	6	75	224

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, nach Elimination von  $\alpha$ -Ketoglutar-säure. Beiden Kaninchen wurden intravenös 78,7 mg Bs/kg Körpergewicht zugeführt; Injektionszeit 4 Minuten. Die Nierenexstirpation bei dem letzten Kaninchen wurde 15 Minuten vor der Bs-Zufuhr ausgeführt. Technik siehe oben.

Das Ergebnis dieses Versuches macht es wahrscheinlich, dass nach Zufuhr von Bs die  $\alpha$ -Ketoglutarsäurekonzentration des Blutes gesteigert wird. Diese Versuche werden fortgesetzt und in einer späteren Arbeit erörtert.

*Für die Bs-Elimination des Organismus sind die Nieren von vorherrschender Bedeutung. Die Bs wird hier grösstenteils umgesetzt. Die Harnausscheidung beläuft sich auf höchstens 5 % der zugeführten Menge Bs. Die Leber kann wahrscheinlich Bs mit geringer Geschwindigkeit umsetzen. Ob Muskulatur und Gehirn mit sehr geringer Geschwindigkeit oder gar nicht Bs umsetzen können, lässt sich mit dieser Methodik nicht entscheiden.*

### Die Bs-Bildung des ganzen Tieres.

Dass der Organismus die Fähigkeit besitzt, Bs zu eliminieren, beweist noch nicht, dass normal eine Bs-Umsetzung und damit eine Bs-Bildung erfolgt. Dass Bs normal in den Geweben vorkommt und dass Bs normal mit dem Harn ausgeschieden wird, kann indessen anzeigen, dass die Bs ein Glied des normalen intermediären Stoffwechsels ist.

Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten für eine etwaige Umwandlung von Bs. *Bs kann in einem Organ (oder mehreren Organen) gebildet und in einem anderen eliminiert werden.* In diesem Fall dürfte die Bs mit dem Blute vom Herstellungszum Eliminationsort gebracht werden. Stoffe, deren Umsetzung in vivo wahrscheinlich nach diesem Prinzip vor sich geht, sind z. B. Acetonkörper und Citronensäure. Die ersteren werden grösstenteils in der Leber gebildet und hauptsächlich in der Muskulatur eliminiert (Literatur siehe bei BLIXENKRONE-MÜLLER 1938). Citronensäure wird wahrscheinlich in den Muskeln gebildet und hauptsächlich in den Nieren eliminiert (Literatur siehe bei MÅRTENSSON 1940). — Die zweite Möglichkeit ist die, *dass Bildung und Elimination der Bs in einem und demselben Organ sich vollzieht.* In diesem Fall hat der Blutkreislauf an der Bs-Umsetzung keinen Anteil.

Wenn die Bs-Bildung in einem Organ (oder in mehreren) stattfindet und die Umsetzung an anderer Stelle im Organismus, so muss dies sich auf zweierlei Weise experimentell feststellen lassen.

1. Das Venenblut des Bs-bildenden Organs muss einen höheren Bs-Gehalt haben als das arterielle Blut. Die gefundenen Normalwerte für den Bs-Gehalt des Venenblutes (S. 86) zeigen keine solche Differenz an. Der Unterschied kann indessen innerhalb der Fehlergrenzen der Methode

liegen. Es ist auch das Venenblut nur weniger Organe untersucht worden, und es ist möglich, dass Bs in einem Organ gebildet werden kann, das in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt worden ist. Das negative Ergebnis schliesst also nicht aus, dass Bs normal in einem der Organe des Körpers gebildet werden kann.

2. Die gebildete Bs wird im Organismus in einem andern Organ als dem Bs-bildenden eliminiert. Vollzieht sich die Umwandlung der Bs nach diesem Prinzip, so muss sich die Bs im Organismus ansammeln und die Blutkonzentration ansteigen, wenn das Bs-eliminierende Organ ausser Funktion gesetzt wird. Die Untersuchung der Bs-Elimination hat gezeigt (siehe S. 93), dass die Nieren bei dieser Elimination von dominierender Bedeutung sind. — Ich habe den Bs-Gehalt des Blutes nach Exstirpation der Nieren gemacht und keine oder eine nur sehr geringfügige Steigerung des Bs-Gehaltes im arteriellen Blut gefunden.

TABELLE 27.

Zeit in Minuten nach Nierenexstirpation	γ Bs/ml Plasma in Arterienblut		γ Citronensäure pro ml Plasma in Arterienblut
	I.	II.	I.
Normalwert	0	2	108
45	0	0	269
120	11		
180		8	

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Citronensäurewerte sind zum Vergleich angegeben. Die Citronenbestimmungen sind im Physiol. Institut, Lund, ausgeführt, wofür ich Herrn Prof. emer. T. Thunberg sehr zu Dank verpflichtet bin.

I. Kaninchen 2,7 kg. in Urethan-Narkose.

II. „ 2,3 kg. „ „ „ .

Für die normale Bs-Umsetzung des Organismus sind die Nieren von keiner oder nur geringer Bedeutung. *Wahrscheinlich vollzieht sich die Bs-Umsetzung normal nicht so, dass die Bs-Bildung in einem Organ, die Elimination in einem andern erfolgt.*

Es bleibt also zu untersuchen, ob die Umsetzung von Bs normal gemäss dem zweiten Prinzip erfolgt: Bs-Bildung und -Elimination in ein und demselben Organ (wahrscheinlich intracellulär). Um dies feststellen zu können, muss man irgendwie die Elimination der Bs in den Geweben hemmen. In Anbetracht des allgemeinen Vorkommens der Succinodehydrogenase ist es wahrscheinlich, dass die Bs-Elimination mit Hilfe dieses Enzyms erfolgt. Es handelte sich in diesem Falle also um eine

Dehydrierung. Der dabei aktivierte Wasserstoff wird in vitro direkt auf das Cytochromsystem<sup>1</sup> und von dort auf Sauerstoff übertragen. Die Bs-Elimination müsste sich demnach durch eine *Verminderung der Sauerstoffzufuhr* hemmen lassen, durch eine *Hemmung der Cytochromoxydase* (z. B. mit Cyanid) und durch *Hemmung der Succinodehydrogenase* beispielsweise mit Malonat oder Pyrophosphat.

#### *Verminderte Sauerstoffzufuhr:*

Kaninchen in Narkose wie oben (siehe S. 84), Entnahme der Blutprobe zur Bs-Bestimmung aus Art. carotis. Die Trachea wird freigelegt, es wird eine Trachealkanüle gelegt und an eine Pumpe zur künstlichen Atmung angeschlossen. Durch einen Schnitt ins Epigastrium und einen kleinen Schnitt ins Diaphragma wird der Thorax eröffnet, so dass die Bewegungen des Herzens und der Lungen während des Versuches direkt beobachtet werden können. Zu Beginn dieser Untersuchung wurde bei den Versuchstieren Anoxämie hervorgerufen, indem die Pumpe so lange gesperrt wurde, wie es die Tiere vertragen konnten. Dann wurde die künstliche Atmung mit gleicher Pumpamplitude und -frequenz wie vor der Anoxämie wiederaufgenommen. Dadurch ergibt sich ein Sauerstoffdefizit, das sich nicht durch tieferes oder schnelleres Atmen (die Atmung wird durch die Pumpe konstant gehalten) wettmachen lässt. — Später ging ich dazu über, die Amplitude der Atmungspumpe so stark zu senken, wie es die Versuchstiere aushalten konnten. Die für das Tier geeignete Verminderung der Sauerstoffzufuhr beurteilt man aus der Grösse der spontanen Atmungsbewegungen, der Grösse der Lungenbewegungen und der Herzfrequenz. Eine sehr verlangsamte Frequenz zeigt den heran nahenden Exitus an. Nach einer gewissen Zeit, während welcher Blutproben zur Bs-Analyse entnommen worden sind, wird die Amplitude der Atmungspumpe wieder so vergrössert, dass der Sauerstoffbedarf des Tieres voll befriedigt wird. Das Atmungszentrum ist bekanntlich gegen ungenügende Lüftung sehr empfindlich. Als Indikator für ausreichende Sauerstoffzufuhr dienen die spontanen Atmungsbewegungen. Wenn diese praktisch aufgehört haben, in der Regel einige Minuten nach der Steigerung der Sauerstoffzufuhr, kann man den Sauerstoffbedarf des Tieres für befriedigt ansehen.

Es ist wichtig, die Amplitude der Atmungspumpe nicht mehr zu vergrössern, als notwendig ist, um die spontanen Atmungsbewegungen verschwinden zu lassen. Eine zu starke Ventilation kann binnen kurzem dazu führen, dass das Herz des Versuchstieres stehenbleibt. — Diese Technik hat den Vorteil, dass sich die Verminderung der Sauerstoffzufuhr leichter

<sup>1</sup> Man glaubt neuerdings nachgewiesen zu haben, dass ein Stoff den Wasserstofftransport zwischen Succinat/Succinodehydrogenase und Cytochrom vermittelt (HOPKINS, LUTWAK-MANN u. MORGAN 1939 und STERN u. MELNICK 1939, zitiert nach STERN 1940).

regulieren lässt als bei der zuerst angewandten Versuchstechnik. Man muss indessen die Sauerstoffzufuhr *stark* drosseln, um eine Einwirkung auf die Bs-Konzentration zu erzielen.

Ein typischer Versuch unter Anwendung der ersteren Technik ist in der nachstehenden Figur wiedergegeben.

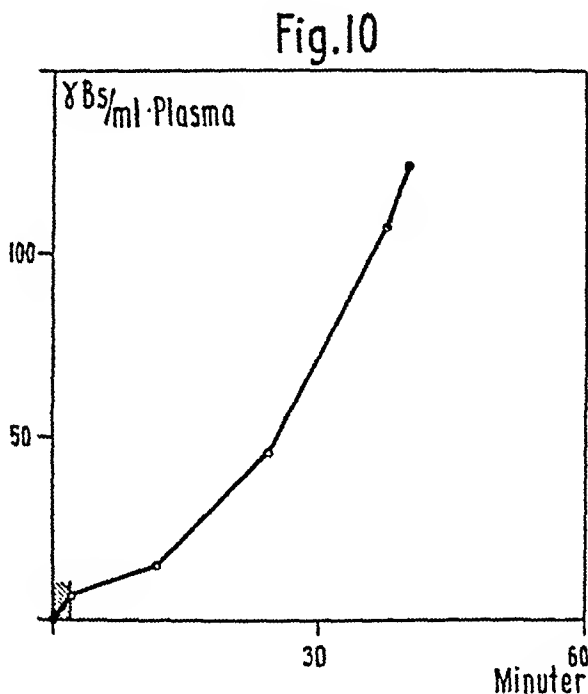


Fig. 10. Bs-Konzentration in Plasma bei verminderter Sauerstoffzufuhr.

Kaninchen 1,9 kg. in Urethan-Narkose. Während 2 Minuten (der schraffierte Teil der Fig.) wurde dem Tiere kein Sauerstoff zugeführt.

Fig. 11, S. 98 gibt zwei typische Beispiele von Versuchen mit der letzteren Technik wieder.

*Die Bs-Konzentration des arteriellen Blutes steigt also nach Drosselung der Sauerstoffzufuhr schnell an.*

Die Erfahrung lehrte, dass diese Drosselung kräftig sein muss, um eine Steigerung des Bs-Gehaltes im Blut hervorrufen zu können. Eine weniger starke Verminderung der Sauerstoffzufuhr bleibt ohne Wirkung auf die Bs-Konzentration.

Einige Einzelheiten sind hier bemerkenswert. Die Bs-Steigerung in Fig. 10 ist bei der dort zur Anwendung gelangten Technik nicht reversibel, sondern progressiv. Bei Verwendung der letzteren Technik erhält man Bs-Kurven von zweierlei Typ (siehe Fig. 11). In dem einen Falle steigt der Bs-Gehalt des Blutes kurz nach Beginn der Anoxämie an. In dem zweiten

Fig. 11

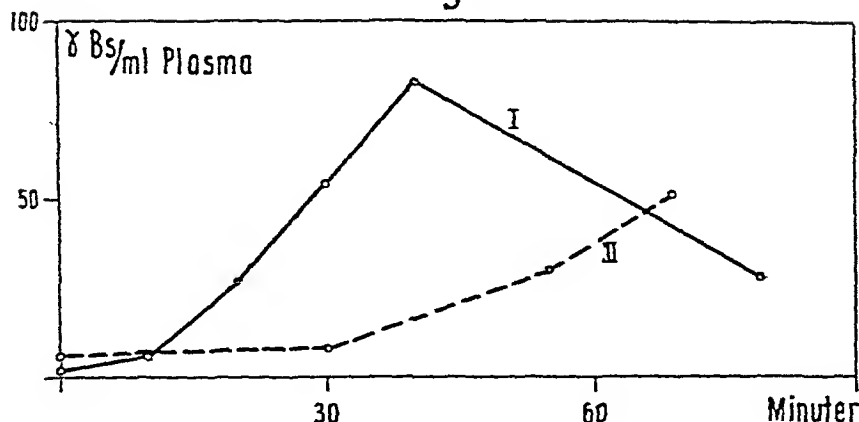


Fig. 11. Bs-Konzentration in Plasma bei verminderter Sauerstoffzufuhr.

Kaninehen in Urethan-Narkose.

I. Verminderung der Sauerstoffzufuhr während der ersten 30,5 Minuten.

II. Verminderung der Sauerstoffzufuhr während der ersten 34 Minuten.

Fall ist der Bs-Wert im Blute während der Anoxämie annähernd unverändert, und er steigt erst an, nachdem wieder die volle Sauerstoffzufuhr eingesetzt hat.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der ersten Erscheinung wurde schon bei der Beschreibung der Versuchstechnik S. 96 vorgelegt. Die Ursache des Phänomens kann auch darin liegen, dass bei Anoxämie in den Geweben schnell Bs gebildet wird, während die Elimination und die Diffusion ins Blut langsam erfolgt. Dies kann es auch erklären, weshalb man bei der letzteren Technik bisweilen erst dann eine Bs-Steigerung sieht, nachdem die volle Sauerstoffzufuhr wieder eingesetzt hat. Die Zunahme der Bs im Blut ist bisweilen nicht reversibel. Die Begleichung des während der Anoxämie eingetretenen grossen Sauerstoffdefizits kann durch den starken Aderlass erschwert worden sein, den die wiederholte Entnahme von Blutproben zur Bs-Bestimmung bedeutet (10 ml Blut für eine Doppelbestimmung). In gewissen Fällen ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass eine irreversible Zellschädigung während der Anoxämie entstanden ist. Dass dies jedoch von geringerer Bedeutung ist, erhellt daraus, dass unter gewissen Versuchsbedingungen (siehe Fig. 11) ein reversibler Bs-Effekt erhalten wird.

Eine verminderte Zufuhr von Sauerstoff in die Gewebe dürfte die Ursache dessen sein, dass der Bs-Gehalt des Blutes nach

sehr starken Aderlässen ansteigt. Dieser Effekt ist im Laufe der Untersuchung festgestellt worden. Die folgende Tabelle gibt einige typische Ergebnisse solcher Versuche wieder.

TABELLE 28.

Zeit in Minuten	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut			
	Versuchstier I	II	III	IV
Normalwert	9	0	0	6
15	12	4	0	5
25				6
30	12	6	4	
38				2
45	11	5	8	9
60	30	28	13	15
90	147 <sup>1</sup>	74	65	

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Versuchstier Kaninchen, in Urethan-Narkose.

I. 2,3 kg. II. 2,2 kg. III. 2,4 kg. IV. 1,8 kg.

Kaninchen in Urethannarkose. Blutprobe aus der Art. carotis. Für jede Bs-Bestimmung wurden 10 ml Blut entnommen. Die angegebenen Bs-Werte sind das Ergebnis von Doppelbestimmungen.

Die Bs-Konzentration des Blutes kann also nach starken Aderlässen erheblich ansteigen. Dies ist bei der Untersuchung des Bs-Umsatzes von praktischer Bedeutung. Im Tierversuch muss diese Aderlasswirkung berücksichtigt werden. Ich habe deshalb kontrolliert, dass ein Aderlass allein von der Stärke, wie sie der Probenentnahme bei den Anoxämieversuchen entspricht, keine Steigerung der Bs-Konzentration im Blut hervorruft (siehe Tabelle 28, Versuch IV).

*Hemmung der Cytochromoxydase:* Versuch mit langsamer intravenöser Injektion von Cyanid (mit dem Infusionsapparat) haben keine befriedigenden Ergebnisse gehabt. Entweder erfolgte die Injektion zu langsam. Das zugeführte Cyanid wurde dann so schnell eliminiert, dass die Atmung der Tiere beinahe unbeeinflusst blieb und keine Bs-Steigerung eintrat. Oder aber die Injektionsgeschwindigkeit war zu hoch, und es trat ein fast augenblicklicher Atmungsstillstand ein. Eine Bs-Steigerung zeigte sich nicht, vermutlich hatte sie keine Zeit, sich zu ent-

<sup>1</sup> Diese Probe ist postmortal aus der rechten Herzkammer entnommen.



wickeln. (Aus den Anoxämieversuchen ging hervor, dass eine gewisse Zeit erforderlich ist, damit sich eine Steigerung des Bs-Gehaltes im Blute einstellen kann.) Ein solcher Atmungsstillstand kann durch künstliche Atmung behoben werden. Eine erneute Cyanidinjektion kann einen abermaligen Stillstand der Atmung verursachen, der seinerseits wiederum durch künstliche Atmung behoben werden kann. Erst indem ich so wiederholte Male in schneller Folge einen Atmungsstillstand hervorrief, konnte ich die Bs-Konzentration des Blutes steigern. Die Versuchsbedingungen sind hier nicht rein. Die Bs-Steigerung kann auch durch mangelnde Sauerstoffzufuhr infolge des wiederholten Atmungsstillstandes verursacht sein. Es war praktisch also unmöglich, eine „chronische“ Cyanidvergiftung der Versuchstiere hervorzurufen.

Das Atmungszentrum dürfte der gegen Cyanid empfindlichste Teil des Organismus sein. Es ist möglich, dass zufriedenstellende Ergebnisse bei Versuchen mit decerebrierten Tieren hätten erhalten werden können. Die Cyanidversuche wurden indessen nicht fortgesetzt, da schon die Anoxämieversuche äusserst wahrscheinlich machen, dass normal in vivo eine Bs-Umsetzung stattfindet.

*Hemmung der Succinodehydrogenase:* Durch die Anoxämieversuche ist gezeigt worden, dass normal in vivo eine Umsetzung von Bs vor sich geht. Es ist indessen doch von Interesse zu untersuchen, wie eine direkte Hemmung der Succinodehydrogenase die Bs-Konzentration im Organismus beeinflusst. Dieses Enzym wird durch Malonsäure, Pyrophosphorsäure und  $\alpha$ -Ketoglutar säure stark gehemmt. Von der spezifischen Hemmung der Malonsäure auf die Succinodehydrogenase war schon die Rede (siehe S. 68). Die Spezifität der Hemmung ist zwar nur eine relative, doch ist die Hemmung der Succinodehydrogenase so stark, dass die Malonsäure für unsern Zweck geeignet sein dürfte. Die Pyrophosphorsäure hemmt die Succinodehydrogenase (LELOIR u. DIXON 1937), doch hemmt sie auch stark die  $\beta$ -Oxybuttersäuredehydrogenase (Literatur siehe bei HOFF-JÖRGENSEN 1940). Ein Enzym im Organismus, Pyrophosphatase, eliminiert ausserdem schnell Pyrophosphorsäure, die also aus mehreren Gründen für unsere Untersuchung ungeeignet ist.  $\alpha$ -Ketoglutar säure hemmt zwar die Succinodehydrogenase stark (siehe S. 52), kann aber mit grosser Wahrscheinlichkeit im Organismus zu Bs umgesetzt werden, was sie für diesen Zweck ungeeignet macht. Malonsäure ist also im Augenblick der ein-

zige Stoff, der sich dazu eignet, in vivo die Succinodehydrogenase zu hemmen.

Malonsäure wurde als Natriummalonat in neutraler Lösung langsam intravenös injiziert (mit dem Infusionsapparat). Malonsäure ist, wie Versuche anderer Autoren gezeigt haben, wenig toxisch (HEYMANS 1889, ROSE 1925, HUSZÁK 1935, ORTEN u. SMITH 1937, KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938, KRUSIUS 1940). Die Tiere waren bei Einverleibung mässiger Dosen (0,5 g pro kg Körpergewicht) anscheinend völlig unbeeinflusst. Die nachstehende Tabelle gibt die Wirkung einer Malonatinjektion auf den Bs-Gehalt des Blutes an.

TABELLE 29.

Zeit in Minuten nach Beendigung der Malonatinjektion	γ Bs/ml Plasma in Arterienblut				γ Citronen- säure/ml Plasma in Arterienblut
	Versuchstier I	II	III	IV	IV
Normalwert	10	0	0	2	45,0
0	17	17	23	—	—
27	—	—	88	—	—
36	—	52	130 <sup>1</sup>	—	—
40	45	—	—	17	76,5
89	—	—	—	13	76,5
100	—	90	—	—	—
162	—	—	—	24	85,5
204	50	—	—	—	—

Kaninchen in Urethan-Narkose. Bs-Bestimmungen nach Elimination von  $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Malonsäure ausgeführt (Technik siehe Kap. II).

I. 0,75 g Malonsäure/kg Körpergewicht; Injektionszeit 22 Minuten.

II. 0,52 g „ /kg „ ; „ 22 „

III. 1,22 g „ /kg „ ; „ 16 „

IV. 0,42 g „ /kg „ ; „ 18 „

Malonsäure als Natriummalonat in 0,4-mol. Lösung intravenös injiziert. (Bei Versuchstier I. wurde 0,2-mol. Lösung verwendet).

Die Versuche zeigen, dass *intravenös injiziertes Malonat eine Steigerung der Bs-Konzentration des Blutes hervorruft*. Diese Steigerung ist äusserst wahrscheinlich auf eine Hemmung der Succinodehydrogenase seitens der Malonsäure zurückzuführen. Unter gewissen Versuchsbedingungen ist die Bs-Wirkung reversibel. Dies beruht darauf, dass der Organismus ihm zuge-

<sup>1</sup> Blutprobe bei Aufhören der Atmung unmittelbar aus der linken Herzkammer entnommen.

führte Malonsäure praktisch vollständig umzusetzen vermag (Literatur siehe bei FLASCHENTRÄGER 1926, STÖHR 1938).

Ein Tier starb 35 Minuten nach intravenöser Injektion von Malonsäure 1,22 g/kg, wahrscheinlich nach geschwächter Herzleistung. Es wäre von Bedeutung festzustellen, dass die Steigerung der Bs-Konzentration im Blut nach Zufuhr von Malonsäure nicht auf einem verminderten Sauerstoffzufuhr an die Gewebe durch Herzdekomensation beruht. Deshalb wurde der Druck im rechten Vorhof während eines Malonatversuchs registriert. Intravenöse Injektion während 44 Minuten von 0,67 g Malonsäure/kg Körpergewicht hatte keinen Einfluss auf den Vorhofdruck. Die Bs-Konzentration im Blute stieg in der gleichen Zeit von 3 auf 22;Bs/ml Plasma.

*Nach den hier wiedergegebenen Versuchen ist es äusserst wahrscheinlich, dass normal in vivo eine starke Bs-Umsetzung stattfindet. Die Gewebe eliminieren wahrscheinlich selbst die dort gebildete Bs. Diese wird oxydativ umgewandelt, in erster Linie mit Hilfe der Succinodehydrogenase.*

### Bs-Bildung in verschiedenen Organen.

Bilden alle Gewebe des Körpers Bs oder dominiert ein besonderes Organ bei der Bs-Bildung? — Um dieses Problem zu lösen, kann man entweder unter Bs-Bildung die arterio-venöse Differenz verschiedener Organe feststellen oder die Bs-Bildung isolierter Organe im Perfusionsversuch studieren. In beiden Fällen muss die Bs-Elimination irgendwie gehemmt werden. In der folgenden Untersuchung wurde diese Hemmung durch verminderte Sauerstoffzufuhr herbeigeführt.

#### *Untersuchung der arterio-venösen Differenz:*

TABELLE 30.

Versuchstier Nr.	γ Bs/ml Plasma			γ Citronensäure/ml Plasma	
	Blut aus Art. carotis, Normalwert	Blut aus Art. carotis, Anoxämiewert	Blut aus V. renalis, Anoxämiewert	Blut aus Art. carotis, Normalwert	Blut aus Art. carotis, Anoxämiewert
I	5	22	0	90	83
II	8	32	0		
III	0	43	0	72	73

Kaninchen in Urethan-Narkose. Technik bei Verminderung der Sauerstoffzufuhr siehe S. 96.

I. 2,1 kg. II. 1,85 kg. III. 1,95 kg.

Zur Technik der Probenentnahme siehe S. 84. Bei diesen Versuchen ist es besonders wichtig, dass die arteriellen und venösen Blutproben gleichzeitig entnommen werden, da sich die Bs-Konzentration im Blute während des Versuchs schnell ändert. Die Sauerstoffzufuhr wurde gemäss der auf S. 96 beschriebenen Methodik (zuletzt angegebene Technik) eingeschränkt. Die angegebenen Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Die Ergebnisse sind Tabelle 30 und 31 zu entnehmen.

Aus den Versuchen geht hervor, dass die Nieren wahrscheinlich keine Bs bilden. Ihre Eliminationsfähigkeit ist offenbar durch die Anoxämie nicht beeinflusst worden. Es besteht zwar eine Möglichkeit, dass in den Nieren gebildete Bs nur in den Harn und nicht ins Venenblut ausgeschieden wird. Ein sicheres Urteil hierüber kann man erst nach näherer Untersuchung der arterio-venösen Differenz, des Minutenvolumens und der Harnausscheidung abgeben. Da diese Frage in der ursprünglichen Problemstellung keinen zentralen Platz einnimmt, wurde diese Untersuchung einstweilen aufgeschoben. — Es wäre bemerkenswert, wenn die Bs-Elimination der Nieren von der Anoxämie unbeeinflusst bliebe. Das Prinzip dieser Versuche war es ja, durch Herabsetzung der Sauerstoffzufuhr die Elimination der Bs zu hemmen. Es bestehen mehrere Möglichkeiten zur Erklärung dieser Erscheinung, doch lasse ich die Frage vorläufig offen. Sie wird den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

Das Blut der V. femoralis und der V. jugularis hat denselben Bs-Gehalt wie das arterielle Blut. Doch kann eine arterio-venöse Differenz innerhalb der Fehlergrenzen unserer Bestimmungsmethode bei grosser Blutströmungsgeschwindigkeit sogar einer starken Bs-Bildung des fraglichen Organs entsprechen. Das Ergebnis schliesst also nicht die Möglichkeit einer Bs-Bildung in diesen Organen aus.

Bei der Untersuchung der Normalwerte für das Venenblut verschiedener Organe wurde bisweilen eine erheblich höhere Bs-Konzentration im Blute der V. hepatica als in dem der V. porta und im arteriellen Blut festgestellt. Dies muss auf Bs-Bildung der Leber zurückzuführen sein. Der kurzdauernde Sauerstoffmangel während der Probenentnahme aus der V. hepatica genügte indessen, um diese Bs-Bildung hervorzurufen. Wurde mit zufriedenstellender Technik (künstliche Atmung durch Trachealkanüle bei Entnahme der Probe) die Möglichkeit eines Sauerstoffmangels ausgeschlossen, so war im Blut aus der V. hepatica, der V. porta und im arteriellen Blut die gleiche Bs-Konzentration festzustellen (siehe S. 86).

Die Ergebnisse bei dieser unfreiwilligen Herabsetzung der Sauerstoffzufuhr sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

TABELLE 31.

Versuchstier Nr.	γ Bs/ml Plasma in Blut aus			
	Art. carotis, Normalwert	Art. carotis, „Anoxämiewert“	V. porta	V. hepatica
I	0	46	57	153
II	19	52	46	121
III	0	14	11	34
IV	—	16 <sup>1</sup>	30	53

Kaninchen in Urethan-Narkose. Die Blutprobe aus der Art. carotis („Anoxämiewert“), V. porta und V. hepatica wurden so schnell wie möglich nacheinander entnommen. Technik siehe S. 84. Die Blutprobe aus der V. hepatica wurde mit der von MÄRTENSSON (1940) angegebenen Methode entnommen.

Die *Leber* kann also bei verminderter Sauerstoffzufuhr Bs bilden.

*Perfusionsversuche:* Wir haben Perfusionsversuche mit isolierter Leber und Hinterkörper bei verminderter Sauerstoffzufuhr ausgeführt. Bezüglich der Perfusionstechnik siehe S. 85. Nach der „Stabilisierungsperiode“ wurde jede Sauerstoffdarreichung eingestellt. Gleichzeitig wurde das „Venenblut“ durch einen Trichter und ein Glasröhrchen direkt auf den Boden des Oxygenators geleitet. Allmählich nahm das Blut mehr und mehr eine venöse Färbung an. Nach einer gewissen Zeit (gewöhnlich nach 30—45 Min.) wurde das Sauerstoffgemisch wieder verabfolgt, so dass das Blut vollständig mit Sauerstoff gesättigt wurde. Dadurch wurde festgestellt dass das Organ auch nach der Anoxämie Sauerstoff verbrauchte und nicht während des Versuches irreversibel geschädigt worden war (siehe Tabelle 32).

Die *Leber* reagiert bei verminderter Sauerstoffzufuhr schnell mit Bs-Bildung. Wird die Perfusion nicht genügend schnell in Gang gesetzt, so findet man schon bei Beginn des Versuches im Perfusionsblut einen hohen Bs-Wert. Dies ist in dem ersten in der Tabelle 32 wiedergegebenen Versuche der Fall.

Aus den Versuchen geht hervor, dass die Bs-bildende

<sup>1</sup> Diese Probe wurde der rechten Herzkammer entnommen.

TABELLE 32.

Versuchstier I		Versuchstier II		
	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Venenblut		$\gamma$ Bs/ml Plasma in	
			Venenblut	Arterienblut
Normalwert .....	81	Normalwert.....	12	7
	79		23	
Nach 36 Minuten verminderter Sauerstoffzufuhr .....	98	Nach 34 Minuten verminderter Sauerstoffzufuhr .....	103	—
Nach 36 Minuten voller Sauerstoffzufuhr .....	110	Nach 52 Minuten voller Sauerstoffzufuhr .....	36	42

I. Kaninchen 7,2 kg. Lebergewicht 175 g. Näheres über Technik siehe S. 85. Die Bs-Werte sind sämtlich Mittelwerte aus 2 Bestimmungen, direkt mit Plasma ausgeführt (Technik 2, S. 64).

II. Kaninchen 2,85 kg. Lebergewicht 105 g. Blutmenge zu Beginn des Versuches 205 ml. Die Bs-Werte sind sämtlich Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, nach Elimination der  $\alpha$ -Ketoglutarensäure.

TABELLE 33.

Versuchstier I		Versuchstier II	
	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Venenblut		$\gamma$ Bs/ml Plasma in Venenblut
	Normalwert .....		2
	7	Nach 20 Minuten verminderter Sauerstoffzufuhr .....	7
Nach 24 Minuten verminderter Sauerstoffzufuhr .....	25	Nach 29 Minuten voller Sauerstoffzufuhr .....	15
Nach 34 Minuten verminderter Sauerstoffzufuhr .....	21	Nach 51 Minuten voller Sauerstoffzufuhr .....	20
Nach 15 Minuten voller Sauerstoffzufuhr .....	27		

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

I. Kaninchen 6,3 kg, Hinterkörpergewicht 2,35 kg. Blutmenge zu Beginn des Versuches 210 ml.

II. Kaninchen 5,2 kg, Hinterkörpergewicht 1,9 kg. Blutmenge zu Beginn des Versuches 165 ml.

Fähigkeit der Leber annähernd gleich der des ganzen Tieres ist<sup>1</sup>.

Bei Leberperfusion ohne Beschränkung der Sauerstoffzufuhr wird keine Bs gebildet, sondern die Bs des Perfusionsblutes wird wahrscheinlich langsam eliminiert (siehe Tabelle 25, S. 91).

*Perfundierter Hinterkörper* bildet ebenfalls bei beschränkter Sauerstoffzufuhr Bs, doch in erheblich geringerer Menge als die Leber unter ähnlichen Versuchsbedingungen, siehe Tabelle 33. Bei Perfusion unter voller Sauerstoffzufuhr wird keine Bs gebildet.

*Von den Organen des Körpers bildet bei beschränkter Sauerstoffzufuhr die Leber wahrscheinlich die meiste Bs. Muskulatur hat unter diesen Versuchsbedingungen eine erheblich geringere Fähigkeit, Bs zu bilden. Die Nieren bilden wahrscheinlich keine Bs und ihre Bs-Elimination geht vermutlich unabhängig von der verminderten Sauerstoffzufuhr weiter.*

### Untersuchung der Bs-Umsetzung bei der Katze.

*Bs-Elimination:* Technik wie beim Kaninchen, siehe S. 84).

TABELLE 34.

Zeit in Minuten nach Beendigung der Bs-Injektion	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut
Normalwert	0
1/2	306
12	35
23	0
41	0

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Katze 2,1 kg. 75 mg Bs/kg Körpergewicht intravenös injiziert während 1 1/2 Minute.

Die Elimination der intravenös injizierten Bs erfolgt also schnell, mit ebenso grosser Geschwindigkeit wie beim Kaninchen.

<sup>1</sup> In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass TOENNISSEN u. BRINKMANN (1930) in ihren bereits erwähnten Perfusionsversuchen mit Kaninchenmuskulatur festgestellt haben, dass Bs-Bildung aus Brenztraubensäure nur bei beschränkter Sauerstoffzufuhr erfolgt.

*Bs-Bildung*: Technik wie beim Kaninchen, siehe S. 96.

TABELLE 35.

Versuchstier I		Versuchstier II		
	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterien- blut		$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterien- blut	$\gamma$ Citronen- säure/ml Plasma
Normalwert .....	0	Normalwert .....	3	
Nach 25 Minu- ten vermindertes Sauerstoffzufuhr	30	Nach 30 Minu- ten vermindertes Sauerstoffzufuhr	4	60
Nach 25 Minu- ten voller Sauer- stoffzufuhr .....	0	Nach 13 Minu- ten voller Sauer- stoffzufuhr .....	19	58
Nach 50 Minu- ten voller Sauer- stoffzufuhr .....	0	Nach 49 Minu- ten voller Sauer- stoffzufuhr .....	73	72

I. Katze 3,00 kg in Urethan-Narkose.

II. Katze 2,25 kg in Urethan-Narkose.

Die Bs-Bildung tritt nach etwa derselben Zeit in Erscheinung wie beim Kaninchen. Der Bs-Effekt kann ebenso wie beim Kaninchen reversibel sein. Wie beim Kaninchen (vgl. S. 98) können bei Anoxämie zweierlei Kurven auftreten.

Diese Versuche machen es *wahrscheinlich*, dass die Bs-Umsetzung beim Kaninchen und bei der Katze in ein und derselben Weise erfolgt.

### Die Bs-Umsetzung und der Tagesrhythmus.

In den letzten Jahren ist darauf hingewiesen worden, dass der intermediäre Stoffwechsel tagesrhythmische Schwankungen aufweisen kann (Literatur siehe bei MÖLLERSTRÖM 1933, JORES 1935, 1937, KALMUS 1938, Verhandlungen der 2. Konferenz der internationalen Gesellschaft für biologische Rhythmusforschung, Stockholm 1940).

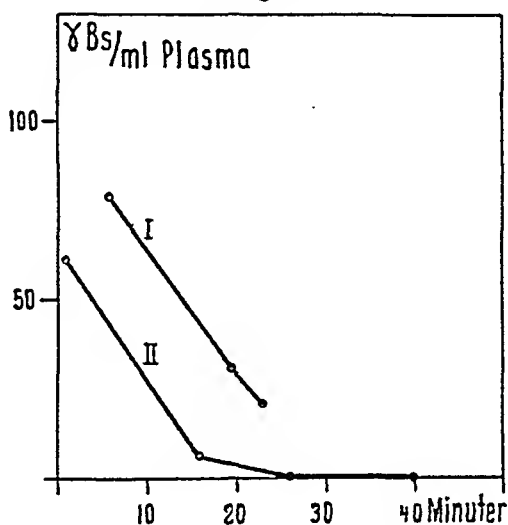
Es wäre daher — nicht zuletzt vom praktisch experimentellen Gesichtspunkt aus — interessant festzustellen, ob tagesrhythmische Variationen auch in der Umsetzung der Bs vorkommen. Um dies in Erfahrung zu bringen, habe ich zwei Methoden gewählt. Teils habe ich die Geschwindigkeit der Bs-Elimina-



tion morgens und abends untersucht, teils nach Bs-Elimination und nach Anoxämie durch histologische Untersuchung feststellen lassen, in welcher Rhythmusphase die Leber sich am Schluss des Versuches befand<sup>1</sup>.

Die *Bs-Elimination* wurde an wachen Tieren ausgeführt. Gleiche Succinatmengen wurden mit gleicher Geschwindigkeit bei den Morgen- und Abendversuchen in eine Ohrenvene gespritzt. Die Blutproben wurden den Venen des andern Ohres entnommen. Die Eliminationsversuche morgens und abends wurden am gleichen Kaninchen ausgeführt, wobei zwischen den beiden Versuchen mindestens 25 Tage verstrichen. Als Beispiel sei der nachstehende Versuch angeführt.

Fig. 12

Fig. 12. *Bs-Elimination und Tagesrhythmus.*

Kaninchen 6,2 kg., nicht narkosiert. 25,4 mg. Bs pro kg. Körpergewicht intravenös während 3 Minuten injiziert.

I. Succinatinjektion vormittags: 10,46—10,49 Uhr.

II. „ „ nachmittags: 18,44—18,47 Uhr.

Es scheint, als ob die *Bs-Elimination* nachmittags etwas schneller vor sich ginge (der Dissimilationsphase der Leber entsprechend). Der Unterschied ist jedoch nicht gross.

<sup>1</sup> Die histologische Untersuchung hat Dozent Hjalmar Holmgren am Karolinischen Institut, Stockholm, ausgeführt, wofür ich ihm sehr zu Dank verpflichtet bin.

Zur *histologischen Untersuchung der Leber* ist zu beachten, dass Äthernarkose den Glykogengehalt der Leber schnell vermindern kann. Die nachstehend aufgeführten Ergebnisse sind also unter Berücksichtigung dieser Fehlerquelle zu betrachten.

Sofort nach Eintritt des Todes wurde ein Stück Leber herausgeschnitten und in absolutem Alkohol fixiert. Glykogenfärbung nach *Best* ausgeführt.

Die arterio-venöse Differenz der Niere während der Elimination der Bs zeigt bei den verschiedenen Rhythmusphasen der Leber keinen merkbaren Unterschied, wie die folgende Tabelle zeigt.

TABELLE 36.

Kaninchen Nr.	γ Bs/ml Plasma im Blut der	
	Art. carotis	V. renalis
26	51	7
28	161	0
88	160	35
89	127	19

Die Blutproben sind während einer langsamen Succinatinjektion entnommen. Näheres über die Technik siehe S. 88.

*Histologische Untersuchung:* Kaninchen 26. Reichliche Mengen Glykogen sind diffus über die ganzen Lobuli verteilt. In den periphersten Zellen der Lobuli etwas weniger Glykogen. Stadium: Maximum der Assimilationsphase.

Kaninchen 28. Mässige Glykogenmengen diffus über die ganzen Lobuli verteilt. Stadium: wahrscheinlich dissimilatorische Phase auf dem Übergang zur assimilatorischen.

Kaninchen 88. Spärliche Glykogenmengen in den Zellen um die V. centralis gesammelt. Stadium: sich dem Dissimilationsmaximum nähernd, also eine Leber in der Dissimilationsphase.

Kaninchen 89. Spärliche bis mässige Glykogenmengen. Die peripheren Zellen der Lobuli enthalten weniger Glykogen als die übrigen. Stadium: auf der Grenze zwischen Dissimilations- und Assimilationsphase.

Bei Anoxämie des Gesamtieres findet man genau das gleiche Bs-Ergebnis bei verschiedenen Rhythmenphasen der Leber. Bezüglich der Versuchstechnik bei Anoxämie siehe S. 96. Als Beispiel wird der folgende Versuch angeführt.

*Histologische Untersuchung:* Kaninchen 65. Sämtliche Zellen der Lobuli sind sehr glykogenreich. Stadium: Assimilationsmaximum.

TABELLE 37.

Kaninchen Nr. 65		Kaninchen Nr. 66	
Zeit in Minuten, nach Beendigung der Drosselung der Sauerstoffzufuhr (während 1 1/2 Minute)	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut	Zeit in Minuten, nach Beendigung der Drosselung der Sauerstoffzufuhr (während 2 Minuten)	$\gamma$ Bs/ml Plasma in Arterienblut
Normalwert	11	Normalwert	0
1/2	18	1/2	6
11,5	41	10	16
22	67	22,5	46
32,5	122	35,5	108
36,5	150	38	124

Kaninchen 66. Glykogenarme Leber. Das Glykogen liegt in den Zellen, welche die zentrale Zone der Leberlobuli bilden. Diese Zellen enthalten nur spärliche Glykogenmengen. Die peripheren Zellen sind in der Regel leer oder enthalten nur wenige Glykogenkörnchen. Verschiedene Zellen enthalten Vakuolen, vermutlich nach ausgelöstem Fett. Stadium: Dissimilationsphase mit Glykogenschwund.

*Die histologische Untersuchung der Leber hat gezeigt, dass die Rhythmuslage der Leber für die Elimination und die Bildung der Bs keine wesentliche Bedeutung hat. Bs-Eliminationsversuche an wachen Tieren zeigen jedoch, dass die Elimination vermutlich nachmittags etwas schneller vor sich geht als vormittags.*

### Besprechung der Ergebnisse.

*Der Organismus kann ihm zugeführte Bs schnell umsetzen, wie aus den Bs-Eliminationsversuchen hervorgeht. Versuche dieser Art („Belastungsversuche“) geben jedoch keine Auskunft darüber, ob eine Umsetzung von Bs normal wirklich stattfindet.*

Indem man die Fähigkeit des Organismus, Bs umzusetzen, hemmt, kann man eine Steigerung des Bs-Gehaltes im Blute (und in den Geweben) hervorrufen. Dies macht es *wahrscheinlich, dass normal in vivo Bs umgesetzt wird.* Bei den hier herrschenden Versuchsbedingungen ist die Bs-Bildung am stärksten in der Leber, weniger stark in der Muskulatur. Die Nieren bilden vermutlich keine oder nur geringfügige Mengen Bs.

Ist die Bs hier ein Metabolit oder ein Katalysator nach Szent-Györgyis C<sub>4</sub>-Säurentheorie? — Wird die Bs-Elimination durch

Beschränkung der Sauerstoffzufuhr gehemmt, so müsste in beiden Fällen die Bs-Konzentration im Blute steigen. Die Anoxämieversuche geben also keine Lösung dieses Problems. Aber die bei den Malonatversuchen in den Geweben und im Blute angesammelte Bs kann nicht aus Fumarsäure gebildet worden sein, wie die Versuche hinsichtlich der Hemmung der Succinodehydrogenase seitens der Malonsäure gezeigt haben (siehe Kap. III). *Die Malonatversuche machen es also äusserst wahrscheinlich, dass die hierbei gebildete Bs ein normales Stoffwechselprodukt ist.* — Wie auf S. 22 dargelegt wurde, schliesst dies nicht die Möglichkeit aus, dass die Bs bei einer gewissen Gleichgewichtslage als Katalysator fungieren kann. In dieser Untersuchung der Bs-Umsetzung in vivo hat sich aber nichts ergeben, was für eine C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse spräche.

*Nach den Versuchsergebnissen ist es somit äusserst wahrscheinlich, dass normal in vivo Bs umgesetzt wird und dass die Bs dabei ein Metabolit ist. Am lebhaftesten scheint die Bs-Umsetzung in der Leber zu sein.*

Die Versuchsergebnisse sagen nichts darüber aus, ob normal in vivo ein Citronensäurezyklus nach Krebs vor sich geht oder nicht. Dass der Citronensäuregehalt des Blutes nach Zufuhr von Malonat ansteigt, kann daran liegen, dass die Malonsäure die für die Umwandlung der Citronensäure notwendigen Enzyme hemmt. Eine solche Hemmung lässt sich für die Citronensäuredehydrierung mit Gurkensamenextrakt nachweisen (THUNBERG, persönl. Mitteilung). Dass der Citronensäuregehalt des Blutes bei Einverleibung von Malonat ansteigt, lässt sich also nicht als Beleg dafür anziehen, dass ein Citronensäurestoffwechsel nach Krebs in vivo stattfindet.

*Die Zunahme von Bs im Blut bei Anoxämie ist u. a. deshalb bedeutungsvoll, weil man auf diese einfache Weise wahrscheinlich die normale Bs-Bildung ablesen kann.* Der Vollständigkeit halber sei bemerkt, dass auch die Konzentration anderer Stoffe im Organismus durch Drosselung der Sauerstoffzufuhr beeinflusst werden kann. Die Zunahme von Bs bei Anoxämie ist also keine auf diesen Stoff beschränkte Erscheinung. Citronensäure wird unregelmässig beeinflusst (siehe Tabelle 30 u. 35). Der Milchsäuregehalt des Blutes steigt bei Anoxämie an (ÖRSKOV 1931). Auch die Oxalsäurekonzentration des Blutes nimmt zu (Literatur siehe bei KAMIYA 1937), ebenso der Ammoniakgehalt (PARNAS u. KLISIECKI 1926).

Die Fragen, die bei weiteren einschlägigen Untersuchungen

zunächst der Lösung harren, sind: Aus welchen Stoffen wird Bs normal gebildet, und welche Stoffe entstehen bei der Elimination der Bs? Diese Probleme werden den Gegenstand fortgesetzter Untersuchungen bilden.

Es ist bemerkenswert, mit welcher Geschwindigkeit Bs bei Anoxämie- und Malonatversuchen ins Blut diffundiert, und zwar sowohl bei Versuchen am ganzen Tier als an isolierter Leber. Aber Bs diffundiert sehr langsam in die Leber und wird hier auch sehr langsam umgesetzt. Dies spricht nicht dafür, dass normal in diesem Organ eine starke Bs-Umsetzung stattfindet (nach den Anoxämieversuchen). Der normale Bs-Gehalt des Blutes der *V. hepatica* ist gleich dem des Blutes, das der Leber zugeführt wird. Perfundierte Leber bildet bei genügender Sauerstoffzufuhr keine Bs. Dies deutet an, dass das Lebergewebe normal alle in der Leber gebildete Bs umzusetzen vermag. — Die Ursache des festgestellten „Missverhältnisses“ zwischen der starken Bs-Bildung und der geringen Bs-Elimination der Leber ist nicht bekannt. Diese Frage muss einstweilen offen bleiben.

Es war von vornherein *wahrscheinlich, dass eine Bs-Umsetzung auch bei anderen Tieren als Kaninchen stattfindet*, da der intermediäre Stoffwechsel der Säuger im grossen ganzen derselbe ist. Eine Bs-Umsetzung des oben geschilderten Typs ist bei der Katze festgestellt worden. Entsprechende Versuche am Menschen auszuführen, ist nicht leicht. In Anbetracht der stark geschwächten Herzleistung, die bei den Kaninchen nach Zufuhr grosser Dosen Bs und Malonsäure festzustellen war, dürften solche Stoffwechselversuche für die Versuchspersonen nicht ganz gefahrlos sein. Statt dessen sind Bs-Bestimmungen im Blut von einigen Patienten mit solchen Krankheiten gemacht worden, bei denen nach den Ergebnissen der Tierversuche eine Hemmung der Bs-Elimination zu erwarten war. Ein erhöhter Bs-Gehalt dieses Blutes hat nicht festgestellt werden können. Doch schliessen diese negativen Befunde die Möglichkeit einer normal stattfindenden Bs-Umsetzung auch beim Menschen nicht aus. Die ausgebliebene Bs-Zunahme beispielweise bei Herzdekompensation kann sich so erklären, dass die Anoxämie nicht genügend hochgradig war, um einen gesteigerten Bs-Gehalt des Blutes zu bewirken. Die Bs-Umsetzung beim Menschen wird daher weiter untersucht werden. (Die ausgeführten Bs-Bestimmungen werden deshalb hier nicht näher erörtert.)

---

## Zusammenfassung.

**K**apitel I gibt einen Überblick über die Literatur, hinsichtlich der Rolle, die die Bernsteinsäure (hier abgekürzt = Bs) im intermediären Stoffwechsel spielt. SZENT-GYÖRGYIS Theorie von der Bs als Katalysator bei der Gewebsoxydation und die Kritik dieser Theorie wird näher erörtert. — Aus der Literaturübersicht geht hervor, dass die Umsetzung von Bs in vivo bisher nur sehr wenig untersucht ist. Die Rolle, die die Bs im Stoffwechsel spielt, ist noch nicht bekannt.

Zielsetzung: Die Umsetzung der Bs in vivo zu erforschen, mit besonderer Berücksichtigung ihrer etwaigen Rolle als Metabolit und Katalysator.

**Kapitel II** beschreibt eine neu ausgearbeitete enzymatische Methode zur Bestimmung von Bs. Mit dieser Methode kann man Bs in Konzentrationen von einigen  $\gamma$  bis etwa 500  $\gamma$ /ml bestimmen. Für Konzentrationen bis 200 erhält man zuverlässige Werte, bei höheren Konzentrationen sind die Analysenergebnisse etwas zu niedrig (etwa 10—15 %). Für eine Bs-Bestimmung sind als Analysenmaterial erforderlich: reine Succinatlösungen 1 ml, Plasma und Serum 2 ml.

Der mittlere Fehler beträgt bei der Doppelbestimmung in reinen Succinatlösungen  $\pm 1,3 \gamma$  Bs, bei der Doppelbestimmung in Plasma und Serum  $\pm 4,7 \gamma$  Bs. (Siehe Tabelle 12, S. 48.)

Die Methode ist hochgradig spezifisch. Die Stoffe von praktischer Bedeutung, die die Bestimmung stören können, sind Hexosediphosphorsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Malonsäure. Für die Bestimmung von Bs in biologischem Material in Gegenwart dieser drei Stoffe wird eine besondere Technik angegeben.

**Kapitel III.** Die Hemmung der Malonsäure auf die Succinodehydrogenase ist durch Messung der Redoxpotentiale bei der Bs-Dehydrierung mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor und bei der Fumarsäurehydrierung mit Leukomethylenblau als Wasserstoffdonator untersucht worden. — Malonsäure hemmt die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäurehydrierung in ungefähr gleichem Grade. (Siehe Fig. 5 u. 6, S. 76 o. 77.)

*Kapitel IV.* Die geeignetste Dosierung der Bs für die Untersuchung ihrer Umwandlung in vivo ist ermittelt worden. Kleinere Bs-Mengen, durch intravenöse Injektion einverleibt, verstärken die Atmung ein wenig, ohne den arteriellen und venösen Druck zu beeinflussen. Grössere Mengen Bs dagegen schwächen die Herztätigkeit, setzen den arteriellen Druck herab und steigern den Venendruck (siehe Fig. 7, S. 81).

*Kapitel V. Methodik:* Die Versuche wurden an ganzen Tieren und an isolierten Organen im Perfusionsverfahren ausgeführt. Als Versuchstiere dienten hauptsächlich Kaninchen.

**Bs-Elimination:** Der Organismus vermag ihm durch intravenöse Injektion einverlebte Bs schnell zu eliminieren. Diese Bs-Elimination vollzieht sich zum grössten Teil durch Umsetzung der Bs in den Nieren (siehe Fig. 9, S. 92, Tabelle 26, S. 93). Nur höchstens 5 % der zugeführten Menge werden mit dem Harn ausgeschieden.

**Bs-Bildung:** Wird die Elimination der Bs durch Drosselung der Sauerstoffzufuhr oder durch Einverleibung von Malonsäure gehemmt, so lässt sich Bs-Bildung in vivo nachweisen (siehe Fig. 10 u. 11, S. 96 u. 97). Am stärksten ist sie in der Leber, weniger stark in der Muskulatur. In den Nieren wird bei Anoxämie wahrscheinlich keine oder nur sehr wenig Bs gebildet. Die Nieren dürften vermutlich unter diesen Versuchsbedingungen sogar Bs eliminieren können.

**Schlussfolgerung:** *Es findet wahrscheinlich normal in vivo eine Umsetzung von Bs statt. Die Bs ist dabei ein Metabolit.* Die Untersuchung hat nichts ergeben, was dafür spräche, dass Bs als Katalysator nach SZENT-GYÖRGYIS C<sub>4</sub>-Säuren-Theorie fungiert. Durch die Ergebnisse wird die Möglichkeit eines Citronensäurezyklus nach KREBS in vivo weder bestätigt noch bestritten.

Der Tagesrythmus ist für die Bs-Umsetzung vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

**Die Bs-Umsetzung anderer Säuger:** Eine Bs-Umsetzung vom gleichen Typus wie beim Kaninchen ist auch bei der Katze festgestellt worden. Tatsachen, die anzeigten, dass die Umwandlung von Bs beim Menschen in gleicher Weise vor sich geht, liegen bisher noch nicht vor. Die diesbezüglichen Untersuchungen werden fortgesetzt.

---

## Summary.

Chap. I. A survey is given of earlier works on the part played by succinic acid<sup>1</sup> in intermediary metabolism. Szent-Györgyi's theory, of succinic acid as catalyst in tissue oxidation, and criticisms of this theory by various authors are analysed more closely. The survey of the relevant literature shows that the metabolism of succinic acid in vivo has only been little examined. The part played by succinic acid in metabolism has not been made clear.

Research plan: To study the metabolism of succinic acid in vivo, especially regarding the part it may play as metabolite or catalyst.

Chap. II. A new enzymatic method of measuring succinic acid has been worked out. — By this method one can measure succinic acid in concentrations of from 1 to about 500  $\gamma$ /ml. Using effective enzyme solutions, reliable results will be found in concentrations from 1 to 200, in stronger succinic acid concentrations the analytic results will be somewhat too low (about 10—15 %). The difficulties in producing effective succinodihydrogenase solutions can at times be great. The amount of substance required for analysis: For pure succinate solutions 1 ml, for plasma or serum 2 ml. The mean error in two succinic acid determinations is  $\pm 1,3 \gamma$  Bs; of plasma or serum  $\pm 4,7\gamma$ /ml. (see table 12 p. 48). The method is highly specific. The substances of practical importance that can disturb the results are hexosediphosphoric acid,  $\alpha$ -ketoglutaric acid and malonic acid. A special technique has been worked out to determinate succinic acid in biological material in which either of these three substances is present.

Chap. III. The inhibition of the succinodihydrogenase by malonic acid has been examined by means of redoxpotential measuring of succinic acid dehydrogenation with methylene blue as hydrogen acceptor and fumaric acid hydrogenation with

<sup>1</sup> Succinic acid here abbreviated Bs.



leucomethylene blue as hydrogen donor. — Malonic acid inhibits the succinic acid dehydrogenation and fumaric acid hydrogenation, both to the same extent (see Fig. 5 and 6, p. 76 and 77).

Chap. IV. The most suitable dose of succinic acid for the examination of its metabolism *in vivo* has been found. Smaller quantities of succinic acid given by intravenous injections somewhat increase breathing without affecting the pressure in arteries or veins. Whereas larger quantities of succinic acid lower the function of the heart, reducing the arterial and increasing the venous pressure (see Fig. 7 p. 81).

Chap. V. *Method*: The experiments have been carried out on entire animals and on isolated organs as perfusion experiments. The animals experimented on were chiefly rabbits.

*Elimination of succinic acid*: The organism can quickly eliminate intravenously administered succinic acid. This elimination is chiefly due to metabolism in the kidneys (see Fig. 9 p. 92, Table 26, p. 93). Only 1—5 % of the succinic acid administered is secreted in the urine.

*The formation of succinic acid*: If the normal elimination of succinic acid is inhibited by reducing the oxygen conveyed or by administering malonic acid, the production of succinic acid *in vivo* can be proved (see Fig. 10 and 11 p. 97—98). This is greater in the liver, less in the muscles. When the oxygen administered is decreased no succinic acid, or hardly any, is formed in the kidneys. The kidneys can probably even eliminate succinic acid under these experimental conditions.

*Conclusion*: *In vivo* a metabolism of succinic acid probably normally takes place. Succinic acid is on these occasions a metabolite. In this research no support has been found of Szent-Györgyi's theory that succinic acid should act as catalyst. The results can neither confirm nor contest the possibility of a citric acid cycle *in vivo*.

*The daily rhythm* is probably of small consequence for the succinic acid metabolism.

*The succinic acid metabolism in other mammals*: Succinic acid metabolism of the same type as in rabbits has also been found in cats. No facts have yet been found tending to show that metabolism of succinic acid takes place in the same way in human beings. The examination of this is being continued.

## Literaturverzeichnis.

- AHLGREN, G., Acta med. scand. 1923, 57, 508; a.  
AHLGREN, G., Skand. Arch. Physiol. 1923, 44, 196; b.  
AHLGREN, G., Acta ophtalm. 1927, 5, 1; a.  
AHLGREN, G., Proc. Mayo Clin. 1927, 3, 86; b.  
AHLGREN, G., Skand. Arch. Physiol. 1938, 80, 16.  
ALBAHARY, J. M., C. r. Acad. Scienc. 1907, 144, 1232; ref. nach Chem. Zbl. 1907, II, 427.  
ANNAU, E., Z. physiol. Chem. 1935, 236, 58.  
ANNAU, E. und STRAUB, F., ibid. 1937, 247, 252.  
ASLANOGLU, P. L., Z. anal. Chem. 1896, 35, 375.  
BAER, J. und BLUM, L., Beitr. chem. Physiol. u. Path. 1907, 10, 80.  
BAER, J. und BLUM, L., ibid. 1908, 11, 101.  
BALASSA, G., Z. physiol. Chem. 1937, 249, 217.  
BANGA, I., ibid. 1935, 236, 20.  
BANGA, I., ibid. 1936, 244, 130.  
BANGA, I., ibid. 1937, 249, 183; a.  
BANGA, I., ibid. 1937, 249, 200; b.  
BANGA, I., ibid. 1937, 249, 205; c.  
BANGA, I. und SZENT-GYÖRGYI, A., Z. physiol. Chem. 1937, 245, 113.  
BANGA, I., OCHOA, S. und PETERS, R., Biochem. J. 1939, 33, 1109.  
BATELLI, F. und STERN, L., Biochem. Z. 1911, 30, 172.  
BECKER-FREYSENG, H. und LIERICH, L.-L., Arch. exp. Pathol. Pharmak. 1938, 188, 598.  
BERNHARD, K. und ANDREAE, M., Z. physiol. Chem. 1937, 245, 103.  
BLIXENKRONE-MÜLLER, N., Diss., Kopenhagen 1938.  
BLUMENTHAL, F., Arch. path. Anat. u. Physiol. 1894, 137, 539.  
BONIFAZI, S., Mitt. Lebensmittelunters. u. Hyg. 1929, 20, 122; ref. nach Z. anal. Chem. 1930, 81, 332.  
BORDAS, F., JOULIN, F. und VON RACZKOWSKI, S., Chem. News 1898, 78, 18; ref. nach Chem. Zbl. 1898, II, 511.  
BOTTINI, E., Z. anal. Chem. 1938, 114, 73.  
BOYLAND, E. und BOYLAND, M. E., Biochem. J. 1936, 30, 224.  
BREUSCH, F. L., Biochem. Z. 1937, 295, 101; a.  
BREUSCH, F. L., Z. physiol. Chem. 1937, 250, 262; b.  
BREUSCH, F. L., Biochem. J. 1939, 33, 1757.

- CARLSTRÖM, B., MYRRÄCK, K., HOLMIN, N. und LARSSON, A., Skand. Veterinärtidskr. 1939, 29, 403.
- CEDRANGOLA, F., Enzymologia, 1937, 1, 359.
- CLARK, W. M., U. S. Public Health Serv. Chem. Rev. 1925, 2, 127.
- CLUTTERBUCK, P. W., Biochem. J. 1927, 21, 512.
- DAS, N. B., *ibid.* 1937, 31, 1124.
- DEWAN, J. G. und GREEN, D. E., *ibid.* 1937, 31, 1074.
- EINBECK, H., Z. physiol. Chem. 1914, 90, 1914.
- EINBECK, H., Biochem. Z. 1919, 95, 296.
- ELLIOTT, K. A. C. und ELLIOTT, F. H., J. biol. Chem. 1939, 127, 457.
- ELLIOTT, K. A. C. und GREIG, M. E., Biochem. J. 1937, 31, 1021.
- VON EULER, H., FRANCKE, W., NILSSON, R. und ZIELE, K., Die Katalasen und die Enzyme der Oxydation und Reduktion (J. F. Bergmann, München 1934).
- FENTON, H. J. H. und JONES, H. O., J. chem. Soc. London 1900, 77, 77.
- FISCHER, F. G., Ber. deutsch. chem. Ges. 1927, 60, II, 2257.
- FLASCHENTRÄGER, B., Z. physiol. Chem. 1926, 159, 297.
- FORSSMAN, S., Kungl. Fysiogr. Sällsk. Förhandl. 1940, 10, Nr. 12.
- FRANKE, W., in Handb. d. Enzyme von Nord-Weidenhagen, 1940, II, 673.
- GLIMM, E. und NITSCHKE, M., Biochem. Z. 1932, 253, 318.
- GREVILLE, G. D., Biochem. J. 1936, 30, 877.
- GREVILLE, G. D., *ibid.* 1937, 31, 2274.
- GREY, E. C., Bull. Soc. Chim. de France 1917, Ser. 4, 21, 136.
- GRIMLUND, K., Skand. Arch. Physiol. 1936, 73, 109.
- GÖZSY, B., Z. physiol. Chem. 1935, 236, 54.
- GÖZSY, B. und SZENT-GYÖRGYI, A., Z. physiol. Chem. 1934, 224, 1.
- HAHN, A., Z. Biol. 1932, 92, 355.
- HAHN, A. und HAARMANN, W., Z. Biol. 1928, 87, 107.
- HALLMAN, N., Acta physiol. scand. 1940, 2, Suppl. 4.
- HARDEN, A., J. Chem. Soc. London 1901, 79, 615.
- HARRISON, K., Biochem. J. 1939, 33, 1465.
- VON DER HEIDE, C. und STEINER, H., Z. Unters. Nahrungs- u. Genussmitt. 1909, 17, 291; ref. nach Chem. Zbl. 1909, I, 1610.
- HEIDUSCHKA, A. und QUINCKE, G., Chem. Zbl. 1907, II, 1870.
- HEYMANS, J. F., Arch. Physiol. (du Bois') 1889, 13, 168.
- HOFF-JÖRGENSEN, E., Skand. Arch. Physiol. 1938, 80, 176
- HOFF-JÖRGENSEN, E., Diss., Kopenhagen 1940.
- HOLST, G., Diss., Lund 1938.
- HUSZÁK, ST., Z. physiol. Chem. 1935, 236, 66.
- HUSZÁK, ST., Biochem. Z. 1940, 303, 349; a.
- HUSZÁK, ST., *ibid.* 1940, 306, 91; b.
- JORES, A., Erg. d. inn. Med. 1935, 48, 574.
- JORES, A., Tabul. Biol. 1937, 14, 77.
- JÖRGENSEN, G., Z. Unters. Nahrungs- u. Genussmitt. 1907, 13, 241; ref. nach Chem. Zbl. 1907, I, 1224.

- KAHLSON, G. und LANDBY, E., Skand. Arch. Physiol. 1937, 77, 301.  
KALMUS, H., Tabul. Biol. 1938, 16, 60.  
KAMIYA, S., Japan. J. Med. Scienc. II. Biochem., 1937, 3, 301.  
KAYSER, R., Z. anal. Chem. 1882, 21, 424.  
KEIM, W., *ibid.* 1891, 30, 405.  
KNOOP, F., Kongressbericht XVI. int. Physiol. Kongress. Zürich 1938, I, 16.  
KORANYI, A. und SZENT-GYÖRGYI, A., Deutsch. Med. Wschr. 1937, 63, 1029.  
KREBS, H. A., in Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 1929, 3, 635.  
KREBS, H. A., Nature 1936, 138, 288.  
KREBS, H. A., Biochem. J. 1938, 32, 108.  
KREBS, H. A., *ibid.* 1940, 34, 460; a.  
KREBS, H. A., *ibid.* 1940, 34, 775 b.  
KREBS, H. A., und COHEN, PH. P., *ibid.* 1939, 33, 1895.  
KREBS, H. A. und EGGLESTON, L. V., *ibid.* 1938, 32, 913.  
KREBS, H. A. und EGGLESTON, L. V., *ibid.* 1940, 34, 442.  
KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A., Enzymologia 1937, 4, 148; a.  
KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A., Biochem. J. 1937, 31, 645; b.  
KREBS, H. A. und JOHNSON, W. A., *ibid.* 1937, 31, 772; c.  
KREBS, H. A., SALVIN, E. und JOHNSON, W. A., *ibid.* 1938, 32, 113.  
KRUSIUS, F.-E., Suomen Kemistilehti (Acta chem. fenn.) B 1938, 11, 10.  
KRUSIUS, F.-E., Acta physiol. scand. 1940, 2, Suppl. 3.  
KÜHNAU, J., Biochem. Z. 1928, 200, 29.  
KUTSCHER, W. und SARREITHER, W., Z. physiol. Chem. 1940, 265, 152.  
LABORDE, J., C. r. Acad. Scienc. 1918, 165, 793; ref. nach Chem. Zbl. 1918, II, 73.  
LARI, K., Z. physiol. Chem. 1935, 236, 31.  
LARI, K., *ibid.* 1936, 244, 142.  
LEHMANN, J., Skand. Arch. Physiol. 1929, 58, 1.  
LEHMANN, J., *ibid.* 1930, 59, (Diss.).  
LEHMANN, J., *ibid.* 1938, 80, 237.  
LEHMANN, J., in Die Methoden der Fermentforschung von E. Bammann u. K. Myrbäck, 1940, 836. (Kap. Das Redoxpotential).  
LEHMANN, J. und HOFF-JÖRGENSEN, E., Skand. Arch. Physiol. 1939, 81, 269.  
LEHNARTZ, E., Lehrbuch der physiologischen Chemie, 2. Aufl., 1937.  
LELOIR, F. und DIXON, M., Enzymologia 1937, 2, 81.  
VON LONGO, B., Z. physiol. Chem. 1877, 1, 213.  
MACAGNO, R., Ber. deutsch. chem. Ges. 1875, 8, 257; ref. nach Z. anal. Chem. 1875, 14, 203.  
MACKAY, E. M., SHERRILL, J. W. und BARNES, R. H., ref. nach Mac Kay et al., J. biol. Chem. 1940, 133, 59.  
MAJER, E. H. und REISNER, H., Biochem. Z. 1933, 263, 340.

- MARFORI, P., *Ann. Chim. Farm.* 1896, **23**, 193; ref. nach *Jahresber. d. Tierchem.* 1897, **26**, 74.
- MASSART, L. und VAN GREMBERGEN, G., *Arch. int. Pharm. et. Thér.* 1938, **60**, 65.
- MARTIUS, C., *Ergebn. Enzymforsch.* 1939, **8**, 247.
- MESTREZAT, W., *C. r. Acad. scien.* 1906, **143**, 185; ref. nach *Chem. Zbl.* 1906, **II**, 714.
- MOYLE, D. M., *Biochem. J.* 1924, **18**, 351.
- MUSSET, A., *Z. anal. Chem.* 1885, **24**, 282.
- MÜLLER, J. A., *Bull. Soc. Chim. Franc.* 1896, *Ser. 3*, **15**, 1203.
- MÜLLER, F. und BUCHWALD, H., *Klin. Wschr.* 1938, **17**, 1364.
- MÄRTENSSON, J., *Acta physiol. scand.* 1940, **1**, Suppl. 2.
- MÖLLERSTRÖM, J., *Arch. int. Med.* 1933, **52**, 649.
- NEEDHAM, D. M., *Biochem. J.* 1927, **21**, 739.
- NEUBERG, C., *Z. Physiol. Chem.* 1900, **31**, 574.
- NEUBERG, C. und RINGER, M., *Biochem. Z.* 1915, **71**, 226.
- NORD, F. F. und WEIDENHAGEN, R., *Handb. d. Enzymol.*, Leipzig 1940.
- NUCCONI, R. und ZACCAGNINI, A., *Z. anal. Chem.* 1932, **87**, 151.
- OECHSNER DE CONINCK, W., *Bull. Soc. Chim. Franc.* 1913, *Ser. 4*, **15**, 93.
- OPPENHEIMER, C., *Die Fermente und ihre Wirkungen*, Suppl. II, den Haag 1939.
- ÖRSKOV, S., *Diss.*, Kopenhagen 1931.
- ORTEN, J. M. und SMITH, A. H., *J. biol. Chem.* 1937, **117**, 555.
- PARNAS, J. K. und KLISIECKI, A., *Biochem. Z.* 1926, **173**, 224.
- PASTEUR, L., *Ann. Chim. Phys.* 1864, *Ser. 3*, **58**, 330.
- PONSFORD, A. PH. und SMEDLEY-MACLEAN, I., *Biochem. J.* 1932, **26**, 1340.
- POTTER, V. R., *J. biol. Chem.* 1940, **134**, 417.
- POZZI-ESCOT, C. r. *Acad. Scien.* 1908, **147**, 600; ref. nach *Chem. Zbl.* 1908, **II**, 1541.
- QUASTEL, J. H., *Biochem. J.* 1926, **20**, 166.
- QUASTEL, J. H. und WOOLDRIDGE, W. R., *ibid.* 1928, **22**, 689.
- RAU, A., *Z. anal. Chem.* 1893, **32**, 482.
- RINGER, A. J., FRANKEL, E. M. und JONAS, L., *J. biol. Chem.* 1913, **14**, 539.
- ROSE, W. C., *J. Pharm. exp. Ther.* 1925, **24**, 123.
- SALANT, W., LIVINGSTON, A. E. und CONNET, H., *J. Pharm. exp. Ther.* 1917, **10**, 123.
- SALANT, W., MITCHELL, C. W. und SCHWARTZE, E. W., *ibid.* 1917, **9**, 511.
- SCHMITT, C. und HIEPE, C., *Z. anal. Chem.* 1882, **21**, 536.
- SÉMICHON, L. und FLANZY, *Ann. des falsific.* 1932, **25**, 416; ref. nach *Z. anal. Chem.* 1933, **95**, 209.
- SHORR, E. und BARKER, S. B., *Biochem. J.* 1939, **33**, 1798.

- SIMOLA, P. E., *Biochem. Z.* 1939, 302, 84.
- SJÖSTRÖM, P. M., *Acta chir. scand.* 1937, 79, Suppl. 49.
- SMYTH, E., *Biochem. J.* 1940, 34, 1046.
- STARE, F. J., *Biochem. J.* 1936, 30, 2257.
- STARE, F. J. und BAUMANN, C. A., *Proc. Roy. Soc.* 1936, B. 121, 338.
- STARE, F. J. und BAUMANN, C. A., *J. biol. Chem.* 1940, 133, 183; a.
- STARE, F. J. und BAUMANN, C. A., *ibid.* 1940, 133; 453; b.
- STERN, K. G., *Ann. Rev. Biochem.* 1940, 9, 1.
- STRAUB, F. B., *Z. physiol. Chem.* 1935, 236, 42.
- STRAUB, F. B., *ibid.* 1936, 244, 117.
- STÖHR, R., *ibid.* 1933, 217, 153.
- STÖHR, R., *Klin. Wschr.* 1938, 17, 1663.
- VAN SUCHTELEN, F. H. H. und ITANO, A., *J. Amer. Chem. Soc.* 1914, 36, 1797.
- SZEGEDY, E., *Z. anal. Chem.* 1937, 109, 95; a.
- SZEGEDY, E., *ibid.* 1937, 109, 316; b.
- SZENT-GYÖRGYI, A., *Z. physiol. Chem.* 1935, 236, 1.
- SZENT-GYÖRGYI, A., *ibid.* 1936, 244, 105.
- SZENT-GYÖRGYI, A., *ibid.* 1937, 249, 211; a.
- SZENT-GYÖRGYI, A., *Studies on Biological Oxidation and some of its Catalysts*, Budapest und Leipzig 1937. b.
- SZENT-GYÖRGYI, A., *Ber. deutsch. chem. Ges.* 1939, 72, 53.
- THOMAS, J., *Enzymologia* 1939, 7, 231.
- THUNBERG, T., *Skand. Arch. Physiol.* 1909, 22, 430.
- THUNBERG, T., *ibid.* 1917, 35, 163; a.
- THUNBERG, T., *Svenska Läkarsällsk. Handl.* 1917, 43, 996; b.
- THUNBERG, T., *Skand. Arch. Physiol.* 1920, 40, 1.
- THUNBERG, T., *Acta med. Scand.* 1938, Suppl. 90, 122.
- TOENNISSEN, E. und BRINKMANN, E., *Z. physiol. Chem.* 1930, 187, 137.
- ULSCH, K., *Chemik. Zeit.* 1899, 23, 625; ref. nach *Chem. Zbl.* 1899, II, 538.
- VERKADE, P. E., VAN DER LEE, J. und VAN ALPHEN, A. J. S., *Z. physiol. Chem.* 1937, 250, 47.
- WEIL-MALHERBE, H., *Biochem. J.* 1936, 30, 665.
- WEIL-MALHERBE, H., *ibid.* 1937, 31, 299; a.
- WEIL-MALHERBE, H., *ibid.* 1937, 31, 2080; b.
- WEIL-MALHERBE, H., *ibid.* 1937, 31, 2202; c.
- WIDMARK, E. M. P., *Handb. biol. Arb. Meth.* 1933, V, 2, 1935.
- WIELAND, H., PROBST, O., WALCH, H., SCHWARZE, W. und RAUCH, K., *Liebigs Ann.* 1939, 542, 145.
- VIRTANEN, A. und FONTELL, N., *Ann. acad. scient. fenn. Ser. A.* 1926, 26, Nr. 10.



**ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA**

**VOL. 2. SUPPLEMENTUM VI**

---

From the Physiology Institute, Helsingfors University, and the  
Neurophysiological Department of the Carolinian Institute, Stockholm.

**COMPONENT POTENTIALS OF  
THE SUBMAXILLARY GLAND  
ELECTROGRAM**

**AND THEIR RELATION TO INNERVATION  
AND SECRETION**

BY

*A. LANGENSKIÖLD*

HELSINGFORS 1941



## E R R A T A

Page 95 line 33	for KEZTYÛS	read KESZTYÛS
Page 95 line 33	for (1937)	read (1938)
Page 98 line 8	for <i>sympathetic salivae</i>	read <i>sympathetic saliva</i>
Page 98 line 13	for <i>chorda saliva</i>	read <i>chorda salivae</i>
Page 108 line 26	for <i>Néerl. Tijdschr</i>	read <i>Nederl. Tijdschr.</i>
Page 108 line 33	for <i>Néerl. Tijdschr.</i>	read <i>Nederl. Tijdschr.</i>
Page 108 line 43	for KEZTYÛS	read KESZTYÛS
Page 108 line 43	for 1937.	read 1938.
Page 109 line 19	for 1926.	read 1927.
Page 109 line 20	for 1927.	read 1926.

## CONTENTS.

	Page
<i>Preface</i> .....	5
I. <i>Historical review</i> .....	7
II. <i>The problems</i> .....	18
III. <i>Methods</i> .....	24
IV. <i>Action potentials of the submaxillary gland during stimulation of the chorda tympani</i> .....	27
A. The normal electrogram .....	27
B. The dependence of the electrogram on different experimental factors .....	29
1. Duration of stimulation .....	30
2. Course of secretion during chorda stimulation .....	33
3. Strength and mode of stimulation .....	34
4. Frequency of stimulation .....	39
5. Repeated periods of stimulation .....	39
6. Different leads .....	45
7. Other factors that might be expected to exercise an influence on the electrogram .....	47
C. Atropine .....	47
D. Eserine .....	49
E. Compression of the carotids .....	53
F. Algebraical summation of the chorda electrogram of two components .....	55
V. <i>Action potentials of the submaxillary gland of cats during stimulation of the sympathetic</i> .....	62
A. The normal sympathetic electrogram of cats .....	62
B. Dependence of the sympathetic electrogram on different experimental factors .....	65
1. Duration of stimulation .....	65
2. Strength of stimulation .....	65
3. Mode and frequency of stimulation .....	65
4. Repeated periods of stimulation .....	66

C. Sympathetic electrogram and the so-called »augmented secretion» .....	68
D. Atropine and eserine .....	68
E. Ergotamine .....	69
VI. <i>Action potentials of the submaxillary gland of cats during simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic</i> .....	71
A. Sympathetic stimulation during chorda stimulation .....	72
B. Chorda stimulation during sympathetic stimulation .....	73
C. Sympathetic stimulation during »eserine off-effects» .....	75
D. Course of secretion during simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic .....	76
VII. <i>Action potentials of the submaxillary gland due to intra-arterial injection of acetylcholine or adrenaline</i> .....	78
A. Acetylcholine .....	78
B. Adrenaline .....	80
C. Discussion of Ach and Adr .....	80
VIII. <i>Relations between chorda and sympathetic electrograms</i> .....	83
A. The chorda and the sympathetic activate the same processes .....	83
B. Diminution of the electrograms with prolonged and repeated periods of stimulation is due to the influence of other processes on those responsible for the potentials..	84
C. The difference between chorda and sympathetic electrograms with regard to the positive component .....	85
D. The difference between chorda and sympathetic electrograms with regard to the negative component .....	87
IX. <i>Action potentials of the submaxillary gland in dogs</i> .....	89
A. The chorda electrogram of dogs .....	89
B. The sympathetic electrogram of dogs .....	90
X. <i>Some central problems in the physiology of the salivary glands in the light of electrophysiological results</i> .....	92
A. Views of other authors on the parasympathetic and sympathetic innervation of the submaxillary gland .....	92
B. The double innervation of the submaxillary gland in the light of electrophysiological results .....	94
C. Relations between the components of the action potential and the composition of the saliva .....	95
XI. <i>Summary</i> .....	101
XII. <i>References</i> .....	107

## P R E F A C E.

For the theme of this treatise I am indebted to Professor RAGNAR GRANIT, to whom I take this opportunity of expressing my profound gratitude for his never-failing interest in the progress of the experimental work and his constant inspiring advice. All the necessary apparatus was kindly placed at my disposal by Professor GRANIT and all the costs of the experiments were defrayed out of funds which he had received from the Rockefeller Foundation.

The work was carried out at the Physiology Institute of Helsingfors University. I wish to express my sincere thanks to Professor Y. REENPÄÄ, Director of the Institute, for the favour of his support.

I am greatly indebted to Mr TOIVO HELME who rendered invaluable assistance in setting up the apparatus and regularly controlled it.

I also thank all who assisted me in my work and helped me in obtaining the test animals.

Helsingfors, February 1941.

ANDERS LANGENSKIÖLD.



## I. Historical review.

BAYLISS and BRADFORD were the first to note action currents in the salivary glands in connection with nerve stimulation. Their results were published in 1885, 1886 and 1887. For the recording of these currents they used a Thomson galvanometer, and stimulation was faradical in periods of about 10 sec. One of the electrodes was placed on the outer surface of the gland, the other at the hilus. Both cats and dogs were used as experimental animals. The electrograms were investigated both in the submaxillary gland and in the parotid-gland. In spite of their slow recording instrument BAYLISS and BRADFORD obtained noteworthy results.

In stimulating the *chorda tympani* they found (1887) increased electronegativity of the outer surface of the submaxillary gland of dogs after a latent period of about 0.37 sec. This deflection they called the first phase. It was, as a rule, succeeded by a second phase in the opposite direction (as in my fig. 4. p. 27). The latency was measured in a few observations obtained with a capillary electrometer. In stimulating the sympathetic, an action current was observed in the submaxillary gland of dogs after 2—3 sec., in which the outer surface of the gland became positive in relation to the hilus, or in other words a change of potential corresponding to the second phase in stimulating the chorda (as in my fig. 4 p. 27). — When stimulating the chorda of cats BAYLISS and BRADFORD (1887) observed a diphasic action current in the submaxillary gland similar to the current initiated by the chorda of dogs. The sympathetic electrogram of cats bore a greater resemblance to the similar chorda electrograms of both animals than to the sympathetic electrogram of dogs.

BAYLISS and BRADFORD (1887) also investigated the influence of atropine on the salivary action currents in both dogs and cats. They noticed that small doses of atropine suppressed chorda secretion and abolished the so-called first phase in the chorda electrograms in both dogs and cats, whereas the opposite so-called second phase, *i.e.* the phase that consisted of decreased electronegativity in the outer surface of the gland, could still be elicited by stimulation. However, this second phase also was abolished by larger doses of atropine (20—40 mg). In sympathetic electrograms of cats the so-called first phase was extinguished by small doses of atropine (2 mg), while the second phase was more resistant and, depending upon its size in different experiments, required 10—40 mg of atropine to be extinguished. The sympathetic electrogram of dogs,

the main direction of which was opposite to all the other electrograms, was only affected by doses of atropine of over 40 mg.

BAYLISS and BRADFORD (1887) investigated the current of rest in the submaxillary gland, but this varied very greatly both as to direction and size in different experiments. BRADFORD (1887, 1888) investigated the action currents in the gland, when strength and frequency of stimulation varied. He found, among other things, that the so-called second phase decreased more than the first phase, when excitation was weakened.

In these first papers dealing with action currents in the salivary glands BAYLISS and BRADFORD (1887) established that chorda electrograms of dogs and cats and sympathetic electrograms of cats are made up of at least two components of opposite direction. One of them is initiated during the so-called first phase, when the outer surface of the gland becomes negative to the hilus, and the other can be traced in the so-called second phase of opposite direction (see *e.g.* my fig. 4. p. 27). On the other hand, sympathetic electrograms of dogs consisted solely of a so-called second phase, when the outer surface became positive in relation to the hilus (see *e.g.* my fig. 29 d, p. 90). When comparing the electrical data with the course and general properties of secretion in their own experiments, they observed that the so-called first phase coincided with copious secretion of a thinly flowing saliva, while the second phase coincided with a scanty secretion of a very viscid saliva. — ECKHARD'S (1860) and LANGLEY'S (1878) investigations had shown that the sympathetic secretion of dogs contained considerably more organic components than the chorda secretion, while the sympathetic secretion of cats contained fewer organic solids than the chorda secretion. This *inter alia*, compared with the difference between the sympathetic electrograms of cats and dogs, led BAYLISS and BRADFORD to assume that a change of potential, in which the outer surface of the gland became more negative, was connected with activity of the so-called secretory fibres assumed by HEIDENHAIN (1868). These were held to produce the secretion of water and salts. The opposite change of potential was to be connected with the so-called trophic fibres, *i.e.* with the secretion of the organic components of the saliva.

The possibility of the recorded action currents being due to vasomotor changes in the gland was ruled out by BAYLISS and BRADFORD (1887) for the reason that the vasomotor fibres of the *chorda tympani* are not affected by the atropine doses (HEIDENHAIN 1872) that abolish the action currents in the gland. BRADFORD (1887) also discussed the possibility that the flow of secretion in the secretory ducts might be the cause of the electrograms or parts of them, but he rejected this possibility, because the latency of the electrical changes was so much shorter than the observed latency of secretion, and because the changes of potential were not affected, when Wharton's duct was compressed. Besides, the outflow of secretion as the compression was taken off did not produce any action currents. On these grounds BRADFORD localised the recorded electrical phenomena in the actual glandular cells.

BECK and ZBYSZEWSKI (1912) were the first to record the action currents of the submaxillary gland by means of a string galvanometer. The test animals were dogs. They found different electrograms in chorda and sympathetic stimulation, but the electrograms varied very much from case to case. The authors write: «La forme de la déviation n'est pas toujours la même, cette forme dépend vraisemblablement de la nature même de la glande, elle s'élève, tantôt brusquement, tantôt lentement». — The recorded sympathetic electrograms were in the same direction as the chorda electrograms. Electrograms were also obtained reflexly. BECK and ZBYSZEWSKI supposed that a deflection in one direction might be connected with what they call «anabolic», a deflection in the other direction with «catabolic» processes.

In 1916 CANNON and CATTELL recorded action currents in the submaxillary gland by means of a d'Arsonval galvanometer. They employed leads in which the «indifferent» electrode was on the subfascial tissue near the gland and claim that more constant results were obtained in this way and that these correspond more closely to the actual changes of potential in the gland. They used cats as test animals. The recorded electrograms were one-phase curves, the gland electrode becoming electronegative in relation to the other lead. The deflection was in the same direction for the chorda and the sympathetic in accordance with BAYLISS and BRADFORD'S (1887) experiments on cats. In order to prove the impossibility of ascribing the electrical changes to the activity of the vascular muscles or changes in the circulation through the gland, CANNON and CATTELL adduce the same arguments as BAYLISS and BRADFORD. In addition they contributed to this question a convincing experiment: intravenous injections of pituitrine, which considerably raised the blood pressure, produced neither secretion nor changes of potential. It was also observed that action currents could still be produced after compression of the carotids.

CANNON and CATTELL (1916) thus drew the same conclusion as the previous workers, that the electrograms were due to secretory processes in the glandular cells. These authors also recorded electrograms after intravenous injections of pilocarpine and adrenaline. They observed that, while the influence of pilocarpine proceeded, stimulation of the chorda did not as a rule affect the electrogram, whereas stimulation of the sympathetic was able to produce a greater rise in the curve. Under the influence of adrenaline the reverse was the case. In connection with some of the pilocarpine experiments CANNON and CATTELL observed an interesting phenomenon which they called the «reversal of the sign of the response» and for which they were unable to find any explanation. This phenomenon consisted in the fact that, when a chorda stimulation was introduced in certain experiments, while the pilocarpine effect was proceeding, the rise in the curve of the potential produced by the pilocarpine was rapidly nullified owing to the chorda stimulation. At the same time the secretion increased which proved that a reversal of the sign of the response did not imply a reduction or cessation of the processes of secretion. This same phenomenon,



though slightly weaker, was also observed occasionally, when the sympathetic was stimulated during the progress of the pilocarpine effect. CANNON and CATTELL expressed no opinions on the possible occurrence of components of different direction in the electrograms.

GESELL (1918—19 a—c, 1920—21 a—c) published several reports of studies on the submaxillary gland under chorda stimulation, the electrical changes of the gland also being recorded by means of a d'Arsonval galvanometer. At the same time GESELL recorded the secretion by counting the drops, the blood pressure and in some experiments, too, the volume-flow of blood through the gland. It is difficult to compare GESELL's works with the present paper and most of the other work in this field, seeing that he recorded the action currents in the gland for several minutes. These changes were plotted on a comparative short abscissa, while the electrograms of most of the other workers were recorded for periods of approximately 5—10 seconds.

During and after chorda stimulation for about 60 sec. GESELL (1918—19 a) obtained an action current with 4 so-called negative waves or components and 4 so-called positive components. This curve extended over a period of 7—8 minutes. Either a «two-gland-lead» or a «one-gland-lead» was used in these experiments.

The former method consisted in placing one of the electrodes on the surface of the gland and the other electrode symmetrically on the corresponding gland of the other side. In the «one-gland-lead» one electrode was placed on the outer surface of the gland, the other at the hilus. The so-called negative components in the electrograms consisted of increased electronegativity at the surface of the active gland, the positive of decreased negativity. Some of these components did not appear at all except during stimulation of more than one minute's duration, and frequently the electrograms in the same experiment differed essentially, although all the factors of the experiment were kept constant as far as possible. The main direction in the chorda electrograms, however, was always what GESELL called negative, *i.e.* the outer surface of the gland became electronegative in relation to the other electrode. BRONK and GESELL (1926) also recorded electrograms during stimulation of the sympathetic in dogs. These had an opposite main direction compared with the chorda electrograms. GESELL (1918—19 a) investigated the dependence of the chorda electrogram on the manner of leading-off and on the strength and duration of the stimulation. Very varying curves were obtained for different leads, but all manners of leading-off corresponded to a fairly constant type of curve. Increased strength of stimulation produced strengthening of both negative and positive waves. Depending upon the length of stimulation the electrograms consisted of fewer or more waves.

GESELL (1918—19 c) correlated his chorda electrograms with the course of secretion, the blood pressure and the volume-flow of blood. He found that with about 1 minute's chorda stimulation secretion was uneven and had two maxima, one of which coincided with the so-called second negative

wave, the other with the third negative wave. It was also established that the maxima which coincided with these waves coincided with maxima in volume-flow of blood. GESELL holds the periodicity of the secretion possibly to be connected with inhibitory action of the chorda, which was assumed by DALE and LAIDLAW (1911—12) and by LANGLEY (1890) on the basis of nicotine and cytisine tests. GESELL (1920—21 c) also performed experiments with atropine and these showed that in some cases an electrogram could be obtained with a reversed main direction, but always with less amplitude than the normal one. All action currents disappeared after larger doses of atropine (over 30 mg). In connection with these atropine experiments GESELL supplies proofs for the opinion that changes in the blood-vessels of the gland during chorda stimulation do not initiate the electrograms. The volume-flow of blood in contrast to the electrical changes was unaffected by an injection of atropine.

BRONK and GESELL (1926) also recorded the alternating current resistance in the submaxillary gland during nerve stimulation and found that it increases. The curves for the changes in resistance were much more constant than the electrograms. This was considered to be in favour of BRONK and GESELL's hypothesis that the recorded changes in resistance constituted «the arithmetic sum» of the changes in the individual cells, while the recorded changes of current constituted «the algebraic sum» of the changes of current of the individual cells. The variations in the electrograms were, in other words, considered to be dependent on accidental differences in the structure of the gland and the manner of leading-off.

RABL (1922) investigated the action currents of the submaxillary gland with special reference to the latent period of the secretion. The changes of current were recorded by means of a string galvanometer and the rise in pressure in the duct of Wharton by means of a sensitive transmission manometer of the Garten type which was coupled to another string galvanometer. The leads were from the outer surface of the gland and the hilus. Dogs in ether narcosis were used as test animals.

RABL (1922) also obtained rather varying electrograms in different experiments, but describes some of their fundamental properties (see fig. 1 a, p. 16). After a latent period of 0.22—0.3 sec. a positive phase sets in under chorda stimulation. A positive phase means in RABL's work increased electronegativity of the outer surface of the gland. The first positive phase was succeeded by a negative phase and then again by a positive one. The latent period was independent of the strength of stimulation. With weaker stimuli the amplitude of the deflection was reduced. The average latency of the secretion was 0.5—0.7 sec. The results with stimulation of the sympathetic were not uniform, but on the whole they corresponded with those of BECK and ZBYSZEWSKI (1912). In his gland electrograms RABL sought for off-effects corresponding to those obtained in electroretinograms, but was unable to find any. He also discussed the origin of the recorded changes of current and came to the conclusion that these were due to differences of potential between the basal surfaces

of the glandular elements and the surfaces that were turned towards the lumen of the gland.

GAYDA (1924) investigated the action currents in the submaxillary gland of dogs with a string galvanometer using nerve stimulation and injection of pilocarpine. The results of stimulation of the sympathetic were inconstant, but with the chorda a fairly constant fundamental type of electrogram is described (see fig. 1 b, p. 16). After a latent period of about 0.25 sec. the outer surface of the gland first becomes faintly positive, but immediately afterwards strongly electronegative in relation to the hilus. Subsequently the curve descends slightly, but soon rises again and then runs roughly parallel to the baseline. After cessation of stimulation a distinct rise is again observed, after which the curve descends to the baseline. GAYDA was thus the first to observe off-effects in the electrograms of salivary glands reminding one of those occurring in electroretinograms. In BECK and ZBYSEWSKI's (1912) work there is, indeed, among the illustrations a chorda electrogram with an off-effect, but this is not discussed in detail in the text.

Fairly extensive works on action currents and resistance changes in the submaxillary gland of dogs and cats have been published by VAN HARREVELD (1929 a—c, 1930 a—e). Electrograms were recorded by means of a string galvanometer. Zinc-zincsulphate electrodes were used. In most of the experiments v. HARREVELD placed one of the electrodes on the outer surface of the gland, the other at the hilus, but he found that the electrograms with these leads were identical to those obtained, when the second electrode was placed on subcutaneous tissue or on the resting gland on the opposite side of the animal. — The secretion was recorded by means of an apparatus which continuously indicated the course of flow of the secretion. In addition the changes in the volume of the gland were recorded by a plethysmographic method in order to study the changes in the size of the blood-vessels. The nerves were stimulated faradically.

In recording the chorda electrograms of dogs v. HARREVELD (1930 a) obtained the following results: The latent period was 0.3 sec. on an average. The electrograms varied a great deal and five different types are described for the first 2 sec. of stimulation (see fig. 1 c, p. 16—17). As a rule the outer surface of the gland first became negative in relation to the hilus. This first phase was generally followed by a wave in the opposite direction, the size and duration of which varied very much. For the course of the curve after the first two seconds three different types are described, one of which consisted in a continued slow increase in electronegativity of the outer surface of the gland, the second being a comparatively horizontal course, and the third type was a decrease in electronegativity of the surface of the gland. After the stimulation had ceased, too, the curve followed different courses, an off-effect occurring in some experiments. This off-effect had different directions in different experiments. — The deflection of the galvanometer during chorda stimulation varied between 0.5—7 mV.

In a small number of experiments the chorda electrogram of cats

was recorded, this being on the whole similar to that of dogs, though displaying smaller variations.

In stimulating the sympathetic v. HARREVELD (1930 a) obtained an electrogram, the main direction of which was the reverse of that of the chorda electrogram, *i.e.* the outer surface became positive in relation to the hilus. The latent period of the sympathetic electrogram was about 0.8 sec., its course was slower than that of the chorda electrogram and the maximum amplitude was 0.3—1.5 mV. In order to obtain an action current stronger stimulation was required than in the case of the chorda.

v. HARREVELD (1930 a) assumed that the electrograms were composed of at least two components of opposite sign. He called the increased electronegativity of the outer surface of the gland the negative phase, and the other the positive one (see fig. 1. c, p. 16—17).

After injecting about 1.5 mg of atropine sulphate v. HARREVELD (1930 a) confirmed the observations of BAYLISS and BRADFORD (1887), that the potential sign of the chorda electrogram altered and that the contour of the action current was simplified. The explanation was that the negative phase was extinguished by atropine, while the positive remained. However, the positive phase was also extinguished after 2—3 mg of atropine, so that it was often difficult to ascertain what dose would give a purely positive phase. Secretion occurred without the negative phase, but ceased after doses of atropine which did not yet abolish the positive phase. v. HARREVELD did not notice any effect of atropine on the sympathetic electrograms of dogs.

In v. HARREVELD'S (1930 a) work the variations of the chorda electrogram due to the intervals between the periods of stimulation and to the strength and frequency of the faradic shocks were investigated. He found that, if stimulation periods of about 10 sec. duration were repeated several times in succession, allowing the response to reach the baseline between them, the positive phase was gradually reduced more and more, so that finally only the negative phase remained. The beginning of the electrograms was interpreted on good grounds as a result of interference between the two components, or in other words as their algebraic sum, the latent period of the negative phase being as a rule considered to be shorter and its ascent more rapid than that of the positive. The off-effects were assumed to depend on a faster return to the baseline of one of the components than of the other. In the case of 2 min. intervals previous stimulation did not affect the electrogram of the next one. — In the event of the strength of the stimulus being reduced the latency of the chorda electrogram grew longer and the amplitude decreased, but it was also observed that the so-called positive phase decreased and disappeared. — In the event of the frequency of stimulation being increased the amplitude of the deflection increased, which was assumed to indicate a relative increase of the negative phase in relation to the positive.

v. HARREVELD (1930 a) also obtained electrograms by means of intra-arterial injections of pilocarpine and adrenaline. In the former case the

curves were comparable to chorda electrograms and in the latter case to sympathetic electrograms. — The latency of the secretion in chorda stimulation was 1.8—6 sec. and that of the sympathetic secretion at least 6 sec. Contrary to BAYLISS and BRADFORD'S (1887) and CANNON and CATTELL'S (1916) observations, v. HARREVELD obtained a sympathetic electrogram of a similar type with cats as with dogs. However, the experiments were few in number.

v. HARREVELD (1930 b) realised that the electrograms recorded by him could not as such be regarded as changes of potential in the gland. For this reason he, like BRONK and GSELL (1926) and PESERICO (1926, 1927) before him, measured the alternating current resistance and, besides, like PESERICO, the direct current resistance in the gland with nerve stimulation. He found that a slight initial decrease of the alternating current resistance in chorda stimulation was succeeded by an increase in it of up to 500 ohm. As the resistance of the resting gland was estimated at 600 ohm and that of the whole circuit in recording the action currents at 5,100 ohm, v. HARREVELD had to expect that the electrograms would be determined to a great extent by these changes in resistance.

He found, indeed, that the potential sign of the later part of the electrograms was determined by the direction of the current that passed through the gland at the beginning of the stimulation, while the potential sign of the earlier part of the curve was independent of this current. From this he concluded that the first part of the curve was mainly due to action potentials in the strict sense of the term, and the latter part chiefly to the changes of resistance. This forced v. HARREVELD (1930 b) to interpret his chorda electrograms as being composed of five different components, two «action currents in a restricted sense» of opposite sign, and three «action» currents dependent on changes of resistance, two of which consisted of a decrease and one of an increase of resistance. He considered, however, that he could eliminate the last three fairly well by an exact compensation of the resting potential. The changes of resistance in the gland were small during sympathetic stimulation, so that the sympathetic electrograms were interpreted as almost pure «action currents in a restricted sense».

v. HARREVELD (1930 c) thoroughly discusses the connection between «action currents in a restricted sense» and the visible glandular processes. With the aid of intra-arterial injections of pituitrine and amylnitrite he excluded the possibility of the electrical changes being due to changes in the size of the blood-vessels. The possibility of the former being due to the flow of secretion in the secretory ducts he excludes on the same grounds as BRADFORD (1887). Thus he, too, localised the recorded action currents in the glandular cells. However, he did not acknowledge any parallelism between secretion and action currents either. — As the negative phase is extinguished by slightly smaller doses of atropine than the positive, v. HARREVELD ventures to presume that the negative phase must be localised closer to the blood vessels, i.e. near the basal part of the cells, while the positive must be localised in that part of the cells which

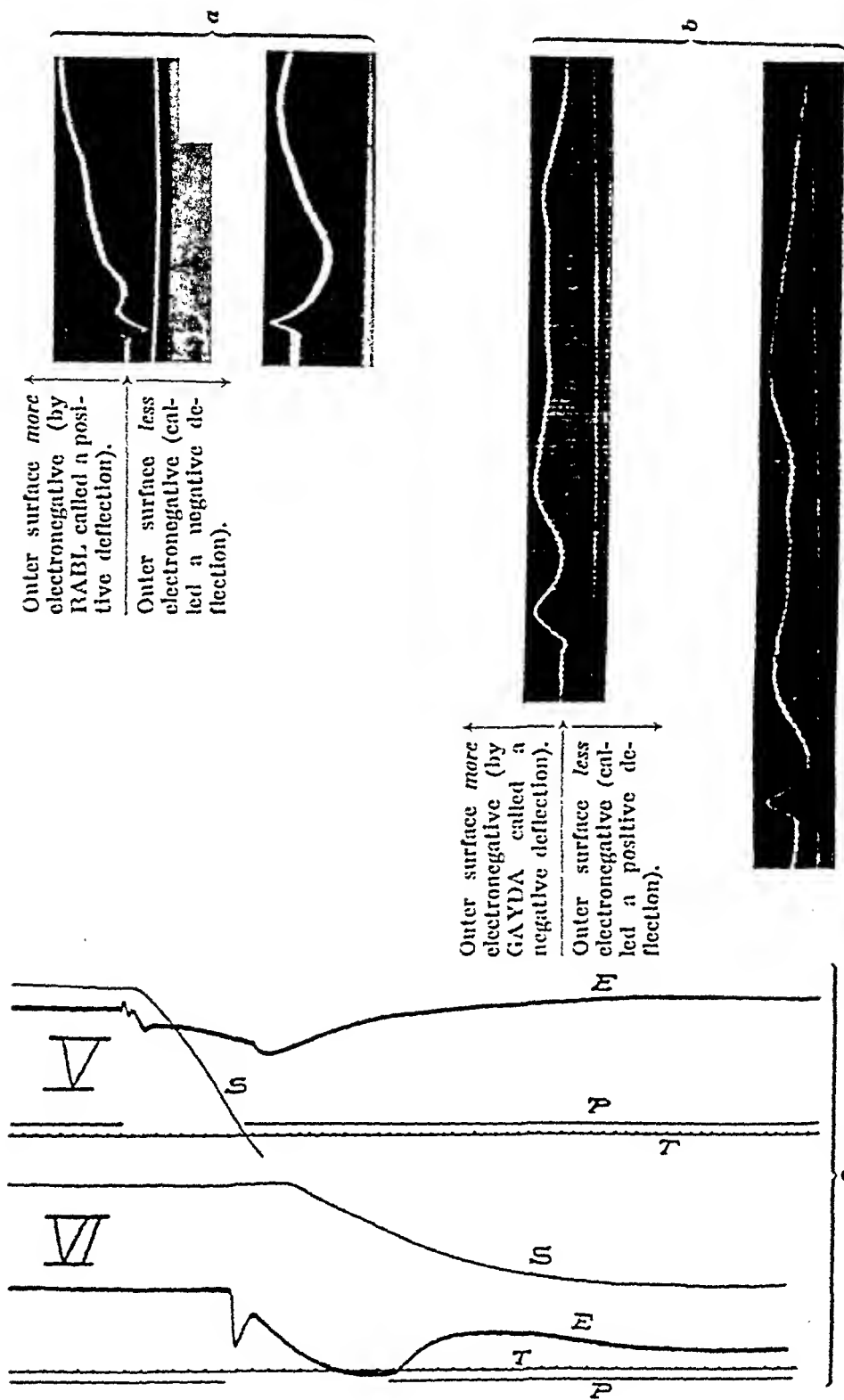
is turned towards the lumen. On the basis of the atropine experiments, too, the secretory processes are localised between the two phases, *i.e.* in the central part of the cells.

Experiments, in which the chorda and the sympathetic were stimulated simultaneously, led v. HARREVELD (1930 c) to presume that these nerves innervate different elements in the gland, the chorda possibly the serous and the sympathetic possibly the mucous elements. The reason for this was his observation that, if stimulation of one of the nerves was initiated, while the stimulation of the other was in progress, the electrogram of the later stimulated nerve appeared in an unaltered form superimposed upon the electrogram of the nerve stimulated first. — v. HARREVELD (1930 c) discusses the leads, *i.e.* what is actually led off from the gland. He comes to the same conclusion as CANNON and CATTELL (1916). The latter considered that the electrode situated on the surface of the gland mainly led off the action potential from the basal surfaces of the glandular cells near the surface, at the electrode, while the other electrode led off the potential of surfaces of these same cells at the end turned towards the glandular lumen.

The first and, so far as I know, hitherto the only work on the action potentials of the submaxillary gland in nerve stimulation, recorded by means of a string galvanometer and amplifier, was published by ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT (1933). They used cats as test animals. Action potentials were recorded during stimulation of the chorda and the sympathetic by separate and repetitive induction shocks. The potential following tetanisation of the chorda, looked like the curves of RABL (1922). No off-effects were observed. ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT distinguished a «quick component» from a «slow component» in the electrograms. They make no mention of the possible existence of components of opposite sign. At times waves were seen on the electrical response of the gland, stimulated faradically or by pilocarpine. Experiments were also performed with atropine. The «slow component» of the chorda response was not extinguished by means of doses of atropine that paralysed secretion. Large doses of atropine extinguished all changes of potential. — The sympathetic electrogram possessed the same main direction as the chorda electrogram.

MORITA (1935) recorded the electrical response of the submaxillary gland of cats and rabbits in exciting the organs of the sense of taste with different agents.

This historical review shows that the works published on the electrical response of the submaxillary gland are comparatively few and brief. It would seem as though the inconstant results in several cases had proved a deterrent from further study of these potentials. — The next section contains a brief comparison of the results obtained by the different authors and of their conclusions.



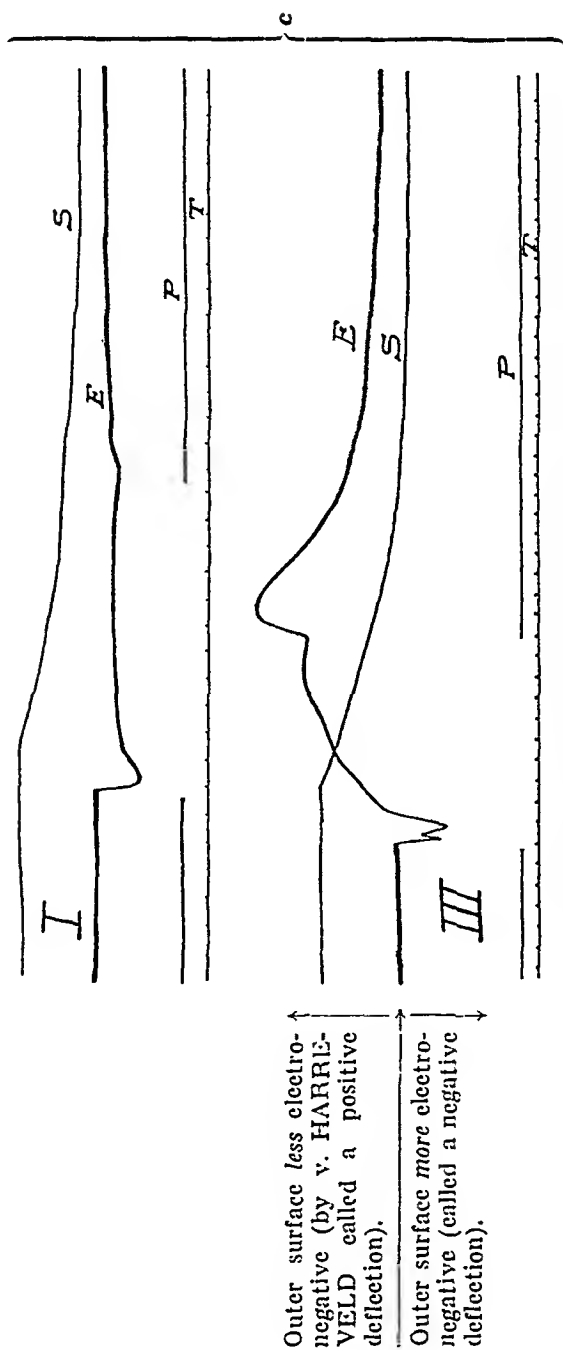


Fig. 1. Different normal types of the chorda electrogram from the papers of: a, RABL (1922); b, GAYDA (1924); c, v. HARRISVELD (1930 a).



## II. The problems.

One of the primary problems of the electrophysiology of the submaxillary gland is the question as to what elements and processes give rise to the response. In stimulating the nerves several processes of different kinds are set in motion which might be expected to be accompanied by electrical phenomena. Thus, the vascular muscles are brought into action, the circulation is greatly changed, the nervous elements are in function, the cells of the gland absorb substances from the blood and expel products of secretion into the lumina in which a strong flow of liquid is set in motion.

The assumption that the vasomotor changes and the altered blood-flow could be the cause of the recorded electrograms, has been excluded on good grounds by several earlier workers. HEIDENHAIN (1872) showed that small doses of atropine which entirely do away with the secretory function of the *chorda tympani*, do not exclude the vasomotor changes produced by chorda stimulation. This was subsequently verified by HENDERSON (1923). He states that the secretory fibres in the chorda of dogs are paralysed by 0.5—2.5 mg of atropine, while the vasodilator fibres are only paralysed by 20—40 mg of atropine. BAYLISS and BRADFORD (1887) established that the chorda electrogram in both dogs and cats and the sympathetic electrogram in cats are extinguished by a few mg of atropine. On the basis of their own experiments and probably also relying on HEIDENHAIN'S statement regarding the sensitivity of the chorda fibres to atropine, these authors concluded that the vasomotor changes did not cause the recorded electrical changes. CANNON and CATTELL (1916) found that injections of pituitrine which produced a strong vasoconstriction, were not accompanied by changes of potential in the gland. v. HARREVELD (1930 a), too, noted the effect of atropine. He injected pituitrine and amylnitrite intra-arterially. Although causing strong vasoconstriction or vasodilatation, the injections failed to produce

any electrical changes. In addition, v. HARREVELD (1930 c) found that the difference between the latency of the electrogram and of the vasoconstriction during stimulation of the sympathetic was 0.2 sec., after injection of adrenaline 1.3 sec. If the action currents were due to vasoconstriction, this difference in latency should have been equal in both cases.

As a number of authors on good grounds have come to the conclusion that the electrical response of the gland, when the nerves are stimulated, cannot be due to vasomotor changes, this conclusion in the present paper has been accepted as a fact, on which further research can be based.

Since the discovery of the streaming potentials in the middle of the 19th century it has been known that a liquid flowing along a solid medium causes considerable differences of potential. It must therefore be taken into consideration that the flow of secretion in the secretory ducts of the gland may be the cause of the recorded electrical changes. BRADFORD (1887) considered that he could exclude this, as the so-called first phase of the action current reached its highest point much earlier than the flow of saliva. Nor could the second phase be connected with the flow of secretion, as the latter ceased after smaller doses of atropine than did the second phase. After compression of the duct of Wharton BRADFORD did not observe any change in the response. CANNON and CATTELL (1916) also noted the same facts as BRADFORD. Neither did the outflow of the secretion held back by the compression of the duct cause any electrical response. v. HARREVELD (1930 c) excluded the possibility of the gland response being due to the flow of secretion in the secretory ducts on the same grounds as BRADFORD.

Several workers have thus come to the unanimous conclusion that the electrical response of the salivary gland is not due to streaming potentials originated in the secretory ducts of the gland.

As the action current therefore cannot be due to either vasomotor changes or to changes in circulation of blood caused by them or to the flow of secretion in the secretory ducts, v. HARREVELD (1930 c) asserted that these currents must have their seat in the glandular cells themselves. ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT (1933) express the same opinion. As this opinion must be considered plausible from a general electrophysiological point of view, this question has not been specially investigated in the present work, where it has been assumed that the secretory cells are the seat of the observed changes of potential.

— The inconstancy of the salivary gland electrograms has been a general feature of all the work on them hitherto published. BAYLISS and BRADFORD (1887) mention that the normal type of the electrograms varies very much in different experiments. GESELL (1918—19 a) observed variations of the type of the response, although everything was done to keep the conditions of the experiments as constant as possible. BECK and ZBYSZEWSKI (1912) also found several different types of curve. v. HARREVELD (1930 a) describes 5 very different individual types of chorda electrograms of the submaxillary gland of dogs in his work, and 3 types of sympathetic electrograms.

On account of this inconstancy, it was difficult for the earlier workers to examine the influence of one definite variable at a time.

The object of the present work, too, is to find a connection between changes of potential and other processes that occur in the submaxillary gland during stimulation of the *chorda tympani* and the *n. sympathicus*. First, however, it was necessary to examine the dependence of the electrograms on various experimental conditions, such as manner of leading off and strength, quality, frequency, and duration of stimulation, and on the intervals between recurring periods of stimulation. Besides, an attempt had to be made to establish, whether the shape of the electrograms was due to other possible factors, such as the position of the nerve on the stimulating electrodes, the consumption of food before the experiments and so on. It was hoped that, by a careful examination of the influence of the experimental conditions on the electrograms, it might be possible to obtain the same normal curve in each experiment. This could then form the starting point for experiments designed with a view to analytic progress. It did not seem likely that the inconstant results were due to individual variations, as has commonly been assumed.

It proved, indeed, that in a series of successful experiments on the submaxillary gland of 45 cats and 4 dogs the same normal type of chorda electrogram could be obtained. The main factor making for constant curves proved to be the use of maximal stimuli. In the same way a comparatively constant normal type of sympathetic electrogram was obtained in a series of 18 experiments on the submaxillary gland of cats.

The course of salivary secretion, its chemical composition in relation to the nerves and the duration and strength of stimulation and other factors are subjects, in which many well-known authors

have taken an interest. Among them, HEIDENHAIN, LANGLEY and BABKIN should be mentioned. — By means of the abundant literature on salivary secretion during nerve stimulation and the investigations in the present paper concerning the electrical response it has been possible to draw some general conclusions regarding the relation of the secretion to the electrical changes.

Several of the workers who studied the action currents of the submaxillary gland examined the reactions to drugs which affect the autonomous nerves, principally atropine. This, as well as eserine and ergotamine, are substances with well-known effects on the gland. There were many opportunities of investigating the reaction of the glandular response to these drugs in the present work, just because it was always possible to start from the same curve and to keep all important factors constant. By means of comparisons between the electrophysiological results and the literature on the action of these drugs on other phases of gland activity it was possible to draw conclusions concerning the relation of the latter to the changes of potential.

LANGLEY and FLETCHER (1890) showed that an interruption of the supply of blood to the gland led to diminished secretion, but that the secretory product contained more mucine than normally after stimulation of the chorda. This was subsequently verified by other workers (CARLSON, GREER and BECHT 1907—08, ANOCHIN and LISAGOR 1930). In the present work typical changes were observed in the chorda electrogram after compression of the carotids. Thus these experiments also afford an opportunity of comparing the effect of the same variable on both secretion and electrical response.

It has been established for a long time, both anatomically and physiologically, that the salivary glands are doubly innervated, *i.e.* by both parasympathetic and sympathetic nerves. Although the innervation of these glands has been investigated in numerous works both by histologists and physiologists, it has been impossible to reach agreement as to whether the individual cells of the salivary gland have double innervation or the parasympathetic and sympathetic supply separately innervate different elements of it. The idea of solving this problem by electrophysiological methods had already occupied the mind of v. HARREVELD (1930 c). By recording electrograms of the submaxillary gland during simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic the latter concluded that the two nerves innervate different elements in the gland.

The question as to whether the two nerves innervate the same or different cells in the gland is undoubtedly of general physiological importance, and it seemed probable that it could be solved by electrophysiological methods. In order to secure satisfactory results by simultaneous stimulation of both nerves, it is essential that the nerve stimulation should be maximal. This is necessary in order to exclude the possibility that elements, which possibly are doubly innervated, are not activated by the stimulation of the one nerve, but are reached by the stimulation of the other. Some circumstances seem to indicate that the stimuli in v. HARREVELD'S (1930 a—c) experiments were often submaximal. Besides, the estimation of his results is rendered more difficult by the inconstancy of the «normal» electrograms themselves.

In order to achieve a physiologically maximal stimulation, it is essential that it should be neither too weak nor too strong and that it should be as adequate as possible. There were greater possibilities of complying with these conditions in the present work by utilising recent technical progress in amplification and artefact control. Tests were made by means of simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic and results were obtained that are directly opposed to those of CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 c).

— BAYLISS and BRADFORD (1887) already assumed that the electrograms consisted of two components of opposite electrical sign, and this must now be considered a fact. On the basis of their experiments regarding the quality of the secretion under different conditions, these workers assumed that one of the components was connected with the secretion of water and salts, the other with the secretion of the organic solids of the secretion. BAYLISS and BRADFORD'S theory that one of the components was connected with the so-called secretory fibres and the other with the trophic ones, was repeated in 1924 by GAYDA, though he does not contribute new arguments to the question as to the connection between the composition of the secretion and the changes of potential. BECK and ZBYSEWSKI (1912) assumed that «anabolic» processes in the cells produced a change of potential in one direction, «catabolic» a change in the other direction. v. HARREVELD (1930 e) considers it probable that both components of the electrogram have their origin in similar processes with different localisation in the cell, the one possibly at the basal part, the other at the part of the cell membrane turned towards the lumen. He considers that the initial part of the complex curve is due to the movement of ions which

takes place, when the permeability of the cell membrane changes rapidly upon stimulation. The comparatively horizontal phase which succeeds the initial complex phase in v. HARREVELD's electrograms, is compared by him to a resting potential which owing to stimulation appears at a different level.

v. HARREVELD's apparatus (1930 a and b), like that of almost all the workers who have investigated these phenomena, recorded not only changes of potential, but also changes of internal resistance which his own measurements proved to be considerable. Therefore analysis of the electrograms was made very difficult. It had, indeed, to be assumed that they consisted of 5 different components. v. HARREVELD discovered no connection between the electrograms and the course of secretion.

In the present work an amplifier guaranteed a practically pure recording of potentials. It was soon found that the electrograms were made up of two components of opposite electrical sign. Fairly good insight into the course and general properties of these components was acquired by experiments with a great many variables. These variables were mostly those used in earlier work on the secretory function of the gland, so that the accumulated knowledge could be put to valuable use.

The aim of the experiments described in this paper was consequently:

1. To define the components in the electrical response of the submaxillary gland in relation to nerve stimulation, and to study the dependence of these components on different experimental factors.
2. To endeavour to draw conclusions as to the nature of these components, by means of comparisons between the author's own and observations of others concerning simultaneous variations in the secretion and the electrical response under identical conditions.
3. To try to find a solution by electrophysiological means, of the problem as to whether the parasympathetic and sympathetic nerve supply innervate the same or different cells in the gland.
4. To contribute, by electrophysiological methods, to the question of the cholinergic and adrenergic properties of the glandular nerves.

### III. Methods.

Reliable and repeatable electrophysiological results were obtained in experiments made with 46 cats and 4 dogs. These had been preceded by a great number of experiments devoted to trying out the technique that led to reproducible electrograms. Once the technique was fully developed, up to 200 electrograms could be obtained from a single animal. The total number of records amounts to about 2500.

Before the experiments the animals were starved for about 20 hours. They were decerebrated under ether or chloroform anaesthesia, after which the lingual nerve and the sympathetic trunk in the neck were isolated and severed. Then the submaxillary gland was prepared free on the same side and its capsule was peeled off from the outer surface. A cannula was inserted into the duct of Wharton. — At least 1 ½ to 2 hours were always allowed to elapse between decerebration and recording.

Silver-silverchloride rods were used as electrodes. These were immersed in U-tubes filled with Ringer's solution with cotton wicks to the animal. One of these was placed on the outer surface of the gland and the other one as a rule on subcutaneous tissue in the decerebration wound. — The action potentials were recorded by means of a small permanent magnet string galvanometer (Edelmann's small model). A two-stage directly-coupled balanced amplifier (TOENNIES 1938), was coupled between the electrodes and the galvanometer (fig. 2, p. 25).

Stimulation was carried out by means of an induction coil or a Neon stimulator. The stimulating electrodes were of the Sherrington T-type and filled with serum. In this way the nerves were kept in good condition for hours and all the time in the same position relative to the electrodes.

For recording secretion a pipette of 2 cm<sup>3</sup> capacity was coupled to the cannula in the duct of Wharton. In order to avoid artificial increase in pressure in the ducts, the position of the pipette during

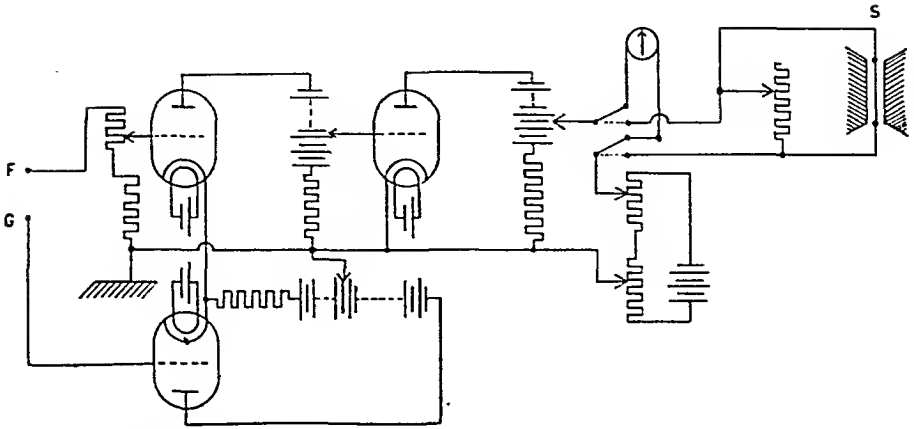


Fig. 2. Diagram of directly coupled, balanced amplifier, connected to a string galvanometer. *F*, lead from subcutaneous fascia. *G*, lead from the gland. *S*, string galvanometer.

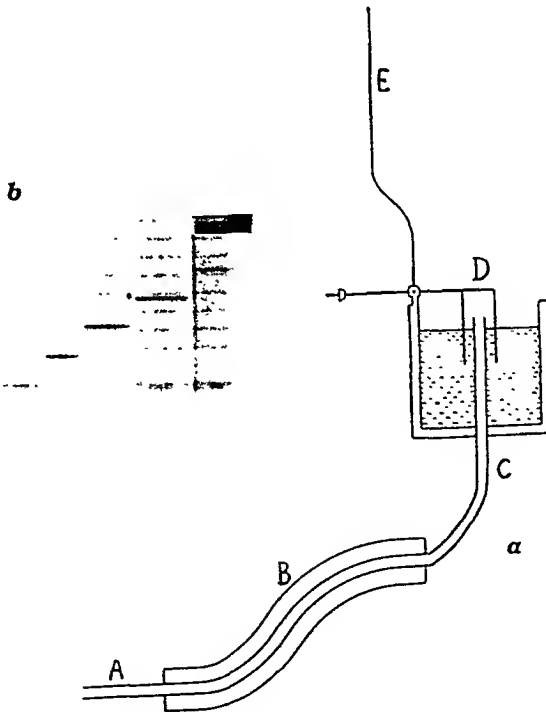


Fig. 3. Apparatus for recording secretion. *a*, A = pipette connected with cannula in the duct of Wharton. B = thick rubber hose. C = metal tube running under the float D above an expanse of water. During secretion the float rises, the indicator E is deflected, this being recorded on the same film as the changes of potential in the gland. *b*, Calibration of the apparatus with  $0.2 \text{ cm}^3$  at a time.



the experiment was horizontal. This pipette was connected through a thick-walled rubber hose with a recording system which continuously followed the course of secretion and the quantity excreted (see fig. 3a, p. 25). The moveable parts of the apparatus are made of light metal. The resistance of the float against the secretion pressure is only a small fraction of the latter. The deflexions of the indicator within the amplitudes employed were proportionate to the excreted quantity of saliva with reasonable accuracy.

In the curve reproduced the height of the indicator above the original level indicates the excreted quantity of saliva and the gradient of the curve the rate of secretion. Fig. 3 b shows a calibration of the apparatus recording secretion.  $0.2 \text{ cm}^3$  of secreted saliva corresponds to the distance of the ordinate between two adjacent levels of the secretion curve.

Chorda stimulation is marked by a signal in the upper edge of the films, sympathetic stimulation by a signal in the middle of the films. A time recorder produced vertical lines over the whole film for each  $1/5$  second.

## IV. Action potentials of the submaxillary gland during stimulation of the chorda tympani.

### A. The normal electrogram.

With maximal stimulation of the *chorda tympani* by means of induction currents or condenser discharges all the 45 experiments with cats yielded an electrogram, the course of which with only slight variations was always the same (fig. 4).

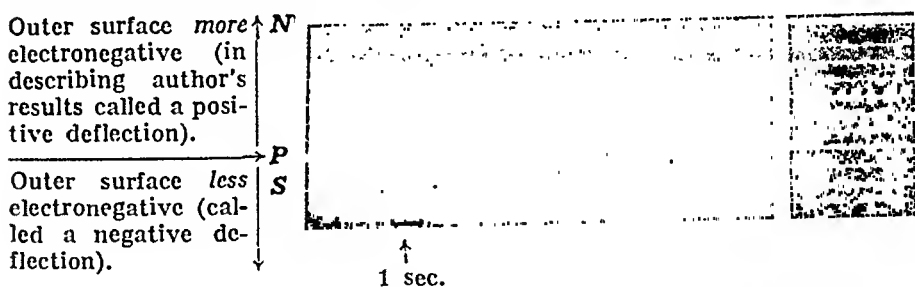


Fig. 4. Normal type of the chorda electrogram of cats. *N* = signal for chorda stimulation. *P* = action potential. *S* = secretion curve. On the right, calibration with 1 millivolt.

After a latent period of 0.20—0.25 sec. the outer surface of the gland rapidly becomes more electronegative in relation to the other electrode. As a rule this electronegativity attains its maximum, which in most cases is about 2.5 mV, within 0.4—0.5 sec. of the beginning of stimulation. After this sharp maximum the curve swings back towards the baseline. This reduction of electronegativity at the surface of the gland ceases as a rule slightly above the baseline and in turn is succeeded by a small secondary wave of electronegativity. These comparatively swift changes of potential take place in about 2 sec., after which the curve again rises, but this time very slowly. When stimulation is stopped (in fig. 4 in about 8 sec.), the curve quickly rises in an off-effect to a maximum of electronegativity which in the majority of cases lies above

the initial peak. This off-effect of electronegativity regularly follows cessation of stimulation. It ends after a rounded culminating point, in a slower drop towards the baseline.

A rise of the curve in fig. 4 as in all the electrograms in this paper, signifies increased electronegativity at the surface of the gland, while a deflection downwards implies reduced electronegativity.

The latency after maximal stimulation did not vary to any extent worth mentioning in different experiments. The height of the initial peak varied from about 0.8—4 mV. In most cases, however, it was about 2.5 mV. After the initial peak the curve in some cases fell below the baseline, while in most of the experiments it stopped above it. The subsequent small secondary wave varied in size. Sometimes it was only faintly indicated and in some experiments only its ascending branch was seen. The slow ascent that succeeded the secondary wave occurred regularly, though varying slightly in degree from case to case. The off-effect was an absolutely constant phenomenon, though its size and rate of change varied to some extent.

If this normal response to maximal stimuli is compared with the chorda electrograms obtained by other workers, it can be stated that all, who used a string galvanometer, obtained curves displaying certain similarities to it. Particular GAYDA's (1924) (see fig. 1 b, p. 16) chorda electrograms only differ from it in one point, for he regularly observed a small downward »preliminary beat». In the present paper a slight indication of this was noted only in a couple of experiments with cats. GAYDA's experiments, however, were performed with dogs, and in my dog experiments such a »preliminary beat» was, indeed, regularly observed, so that GAYDA's chorda electrograms and my normal electrogram described above may be considered to correspond very well with each other. But the chorda electrograms described by other authors differ appreciably from the one described, although a certain similarity in regard to the initial changes of potential can also be traced in BECK and ZBYSZEWSKI's (1912), RABL's (1922) and v. HARREVELD's (1929 b, 1930 a—c) curves. These authors' electrograms also varied very much, whereas the recording of the normal type obtained by GAYDA and in the present work was connected with fairly constant results.

Already BAYLISS and BRADFORD (1887) assumed on good grounds that the electrogram was composed of two components of opposite sign. The same assumption was made by v. HARREVELD (1930

a—c) concerning the »action current in a restricted sense» following upon stimulation of the chorda.

The normal electrogram with its off-effect obtained in the present work already allows the assumption that it may be composed of at least two opposite components. Besides, the great similarity to the action potentials in the retina is striking. It was proved by GRANIT (1933) that the electroretinogram was composed of three components, one of which swung in the opposite direction to the other two.

In the present work all the experiments tend to show that the chorda electrogram is composed of two components of opposite sign. As the presentation of the results will be greatly simplified, if the two components are defined at once, a short definition of them is given. — In accordance with the terminology adopted in work on the electroretinogram, the component that swings upwards in the record, will be called the positive component, and the component that swings downward will be called the negative one (cf. fig. 4, p. 27). The positive component tends to make the surface of the gland more electronegative, the negative to make it less electronegative. In the following pages the terms »positive» and »negative» component will be used in this sense.

## **B. The dependence of the electrogram on different experimental factors.**

In the standard leads used (one electrode on the outer surface of the gland, and the other one on subcutaneous tissue in the decerebrating wound) the shape of the chorda electrogram proved to be dependent on the following variables: the strength and the frequency of stimulation, the position of the stimulating electrodes in relation to the nerve, the duration of the stimulation and the intervals between different periods of stimulation. The dependence of the electrogram on these factors was investigated systematically by varying a single factor, while all the others were kept constant.

A study of the influence of these factors was necessary above all, because otherwise it would have been impossible to estimate the results obtained by introducing new variables such as drugs, simultaneous stimulation of both nerves etc. Besides, the influence of these factors on the secretion was well-known from the work of many authors, so that comparisons between variations in the secretion and the electrogram under the same conditions should be of interest.

### 1. Duration of stimulation.

The course of the chorda electrogram during varying periods of maximal stimulation displayed very regular and typical variations that were investigated in over 30 experiments. The frequency of stimulation was in most cases slightly below the frequency, 40 induction shocks per second, which WEDENSKY (1892) gives as the optimum for the secretory fibres in the chorda. KUPALOFF and SKIPIN (1934) mention that a maximal secretion with induction shocks was obtained in chorda stimulation with frequencies of 10—30 shocks per sec. ROSENBLUETH (1932) found a secretion maximum for the submaxillary gland during chorda stimulation with 36 shocks per sec.

With durations below 0.2 sec. a chorda electrogram is obtained which only consists of a simple positive deflection, the height of which falls short of the height of the so-called initial peak of longer periods of stimulation. Stimulation of 0.2—0.3 sec. produces a simple positive peak of the same height as for longer periods of durations, i. e. in most cases about 2.5 mV. When the stimulation exceeds 0.3 sec., the electrogram as a rule begins to acquire a diphasic form. Between two positive maxima a depression is visible which becomes larger and larger, when the duration of the stimulation in a series of electrograms is increased from about 0.3—0.8 sec. In these cases the second maximum corresponds to an off-effect. When the duration of stimulation exceeds about 0.8 sec., the negative depression ceases to increase. When the period of stimulation is prolonged still further, the small so-called secondary wave begins to occur between the initial peak and the off-effect. When the period of stimulation exceeds 2 sec., the electrogram contains all the parts that form the normal fully developed electrogram of fig. 4.

Fig. 5 (p. 31) illustrates the course of the electrogram during different periods of stimulation, fig. 5 a for about 6 sec. stimulation, fig. 5 b for about 33 sec. The curves show that with increased duration of the stimulation the off-effect again becomes smaller, *though its peak always lies at about the same level*. After the changes of potential in the first 2 sec. the curve ascends slowly and continuously and the size of the off-effect is thus determined by the level of the curve, when stimulation is interrupted. With stimuli of very long duration the curve attains the height, at which the peak of the off-effect usually lies. Then no off-effect is obtained, the curve descending, after the stimulation has ceased,

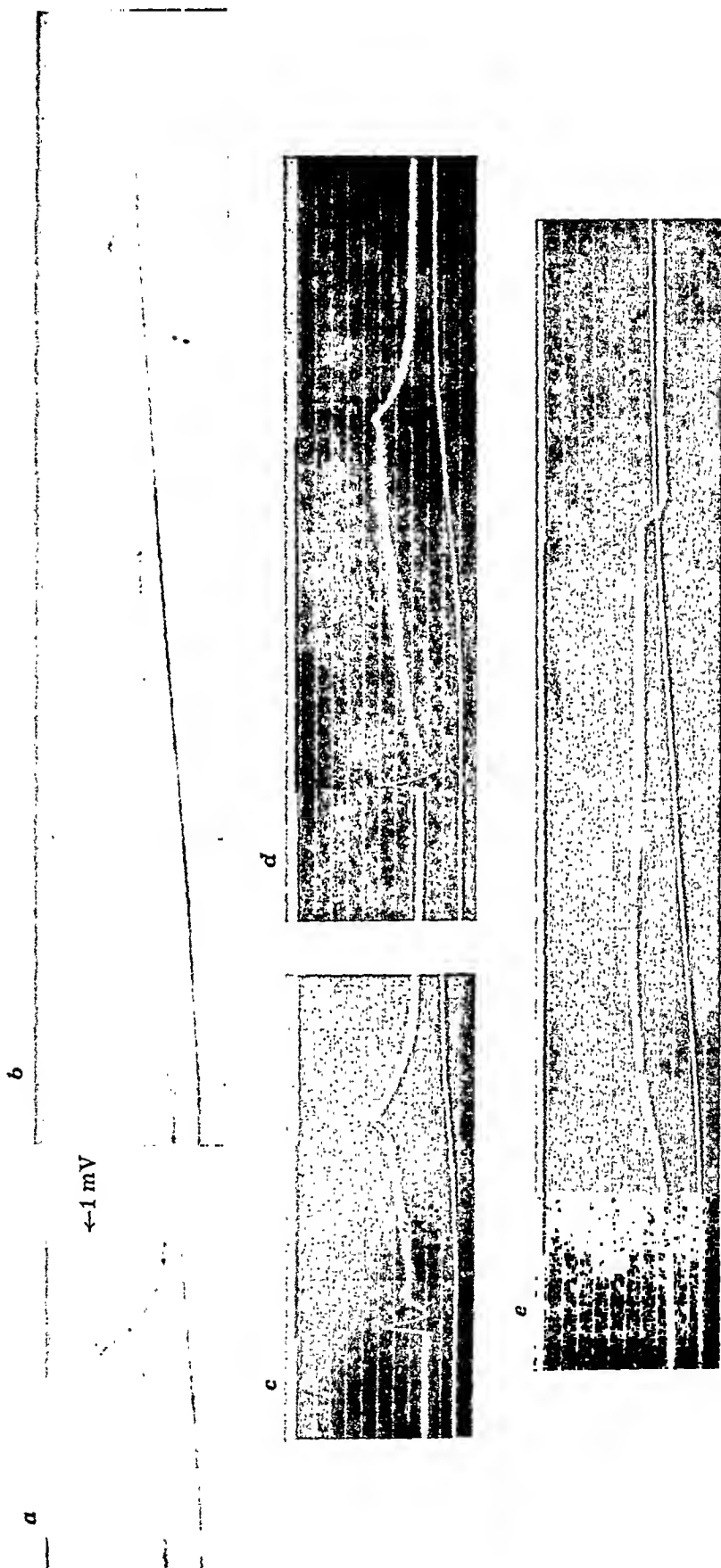


Fig. 5. Chorda electrograms for different times of stimulation. *a* (stim. 6.2 sec.) and *b* (stim. 32.7 sec.) at the beginning of an experiment, *c* — *e* at a later stage of the same experiment. *f*, (see next page) Semi-schematic picture showing the course of the chorda electrogram with different times of stimulation. The continuous curve shows the course of the electrogram, when stimulation lasts for over 50 seconds. The dotted off-effects show the course of the curve after cessation of stimulation at different times.

towards the baseline. The limit of the period of stimulation, for which an off-effect is no longer obtained, also varies in different experiments with maximal stimuli, but in general it lies between 25 and 50 sec. If the stimulation is continued beyond this period of stimulation, the response gradually descends towards the baseline which, however, it does not reach, as a rule, even though the duration of the excitatory periods is extended to 1.5 or 2 minutes.

At the beginning of an experiment the off-effect is obtained with stimulation of longer duration than towards the end of it. The oftener and the longer the gland has secreted, the steeper is the slow ascent following the initial changes of potential. Fig. 5 c, d and e are three chorda electrograms for different durations of stimulation, recorded at a later stage of the same experiment as 5 a and b. It will be seen that in this case no off-effect is obtained any longer for a duration of stimulation, that gave a very distinct off-effect at an earlier stage of the experiment. Fig. 5 f shows a semi-schematic picture of the course of the chorda electrogram for different periods of stimulation. The line drawn in full indicates the course of the curve, the dotted off-effects show its properties for different periods of stimulation.

v. HARREVELD (1930 b) assumed that the off-effect of the chorda electrogram was due to one of the components ending sooner after stimulation than another component. The experiments with different periods of stimulation described above undoubtedly indicate the correctness of this view, though he was wrong in always believing the off-effects not to belong to the action potential (his action current in a restricted sense).

The slow ascent after the first 2 sec. of stimulation, must be assumed to be due to a gradual diminution of the negative component, while the positive remains fairly constant. This must be assumed, because the maximum of the off-effect always lies at approximately the same level above

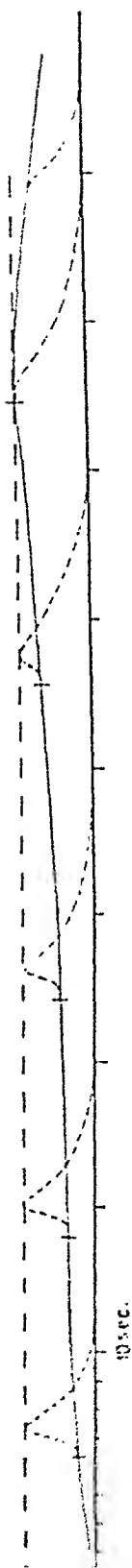


Fig. 5 f. (see previous page).

the baseline. When off-effects are no longer obtained, it may be assumed that the negative component has ceased. The fact that the curve again descends with further increased duration of stimulation, must be due to the positive component beginning to decrease in its turn. Sometimes, when the off-effect is not obtained, the curve lies slightly below the general level of the maximum of the off-effects for shorter durations. This must be assumed to be due to the positive component beginning to decrease shortly before the negative has entirely ceased.

That the negative component and the off-effect decrease in parallel with extended duration of stimulation, makes it necessary to assume that periods of 3—15 sec. are the most suitable ones for studying the chorda electrogram as a function of different variables. Such periods of stimulation have been employed in most of the analytical work of the following pages.

## *2. Course of secretion during chorda stimulation.*

The secretion, or rather, the flow of saliva from the gland, was followed in 16 experiments by means of the apparatus described, and recorded on the same film as the potentials. In most of the other experiments the secretion was only observed in a pipette connected to the cannula in the duct.

The latency of the flow of saliva was estimated at 0.6—2.0 sec. RABL (1922), who recorded the salivary flow by means of very sensitive instruments, found the latency of the latter to be on an average 0.5—0.7 sec. Naturally, the apparatus employed for recording the secretion in the present work reacted more slowly than RABL's and therefore yielded a higher value for the latency.

When the flow of saliva sets in, it is possible, as a rule, to observe an acceleration of the secretion during the first 10 seconds of stimulation, after which the flow of saliva continues at a fairly even rate at least during the next 20 sec. No certain observations concerning the course of secretion after the first 30 seconds of stimulation could be made, as these prolonged periods of stimulation were only used in a comparatively small number of the experiments, in which the flow of saliva was recorded.

The relation of the secretion to the off-effect was of especial interest. The first appearance of the negative component in the retinal electrogram is accompanied by inhibition (GRANIT 1933, GRANIT and THERMAN 1934, 1935), and the retinal off-effect is known to be accompanied by a renewed discharge of impulses in



the optic nerve. — If the negative component in the chorda electrogram were connected with inhibition of the glandular secretion, an increase in the rate of secretion might have been expected in connection with the off-effect. This, however, is not the case. The flow of saliva decreases immediately after stimulation, but does not cease until the curve has descended to the baseline. If stimulation be extended until no off-effect is elicited, the secretion diminishes in the same way and at the same time as the baseline after cessation of stimulation is reached, which in this case takes place considerably earlier than when an off-effect is present. In other words, secretion ends with the positive component.

### 3. *Strength and mode of stimulation.*

The dependence of the chorda electrogram on strength of stimulation was investigated in 18 experiments. This factor proved to be of very great importance. The curves obtained with weak stimuli differed very much in shape from those obtained with stronger stimuli. In practically all the experiments that part of the *chorda tympani* which runs through the lingual nerve was stimulated. This nerve is purely afferent with the exception of the chorda. The afferent portion is not connected with the salivary gland. The stimulation of the whole lingual nerve could therefore scarcely give rise to any sources of error.

On the other hand it led to the result that the position of the nerve on the electrodes had a great influence on the strength of the stimuli for the chorda. The reason for this must be that the fibres of the latter were easily shunted unless they happened to be very precisely placed on the electrodes. A slight dislocation of the lingual nerve on the electrodes could therefore alter the effective strength of the stimuli in a very marked degree. Only HEIDENHAIN (1878) seems to have taken any notice of this fact which certainly explains many «individual variations».

Fig. 6 A (p. 35) shows a number of chorda electrograms illustrating increasing strength of stimulation. From these curves it is evident, above all, that with weak stimuli the off-effect is small or non-existent, whereas with stronger ones it dominates the whole picture of the response. The latent period is slightly longer with weaker stimuli. Likewise the ascent of the initial positive wave (peak) is slightly slower for weaker stimuli.

In the series of electrograms shown in fig. 6 A the initial positive wave decreases, while at the same time the off-effect

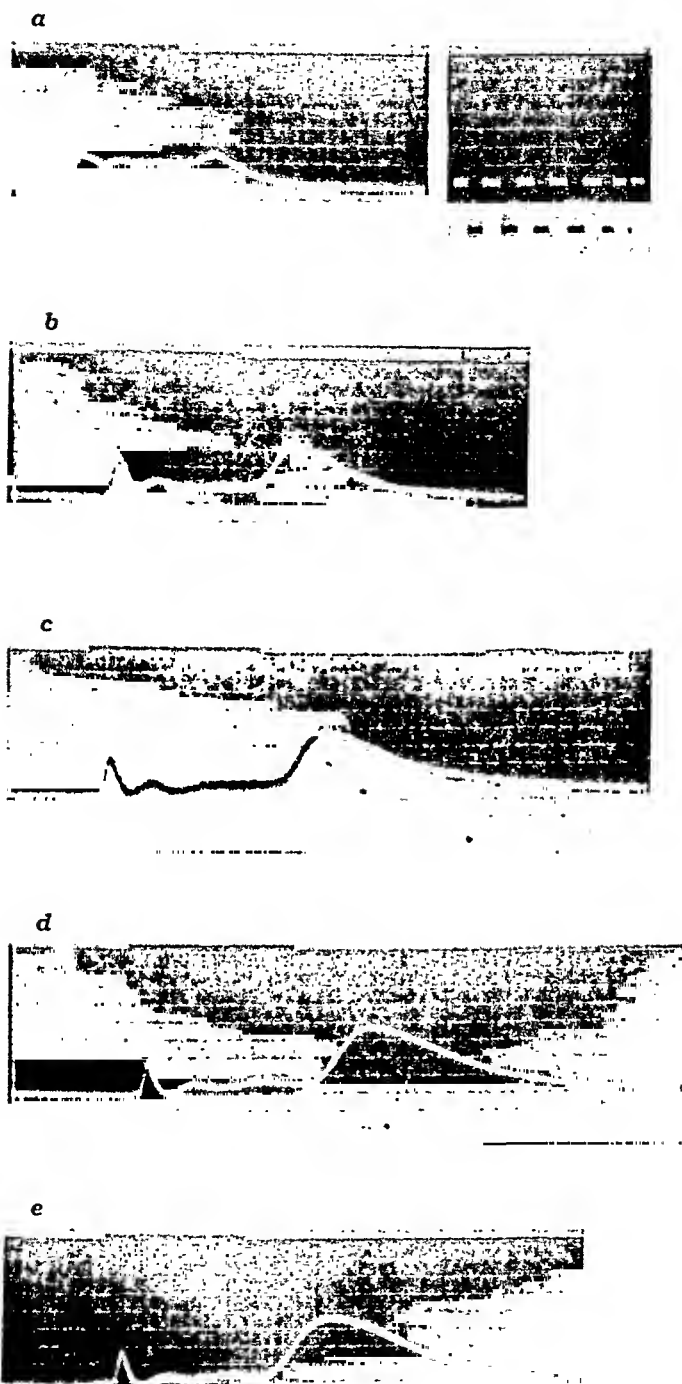


Fig. 6 A. Chorda electrograms for different strength of stimulation. *a*, With a coil distance of 11 cm. *b*, 10 cm. *c*, 9 cm. *d*, 8 cm. *e*, 7 cm. Calibration with 1 mV for *a*—*e*.

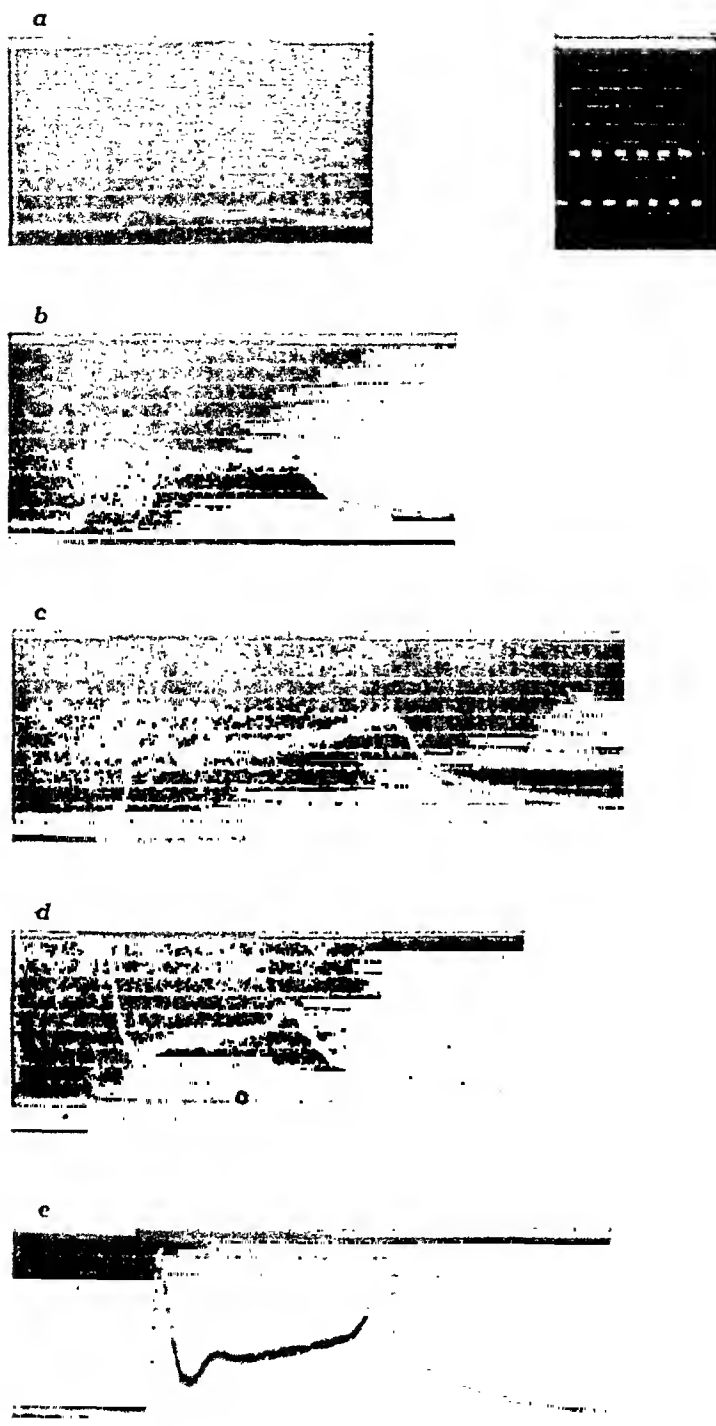


Fig. 6 B. Chorda electrograms for different strength of stimulation. *a*, 12 cm coil distance. *b*, 10.5 cm. *c*, 10 cm. *d*, 9.5 cm. *e*, 9 cm. Calibration with 1 mV for *a* — *e*.

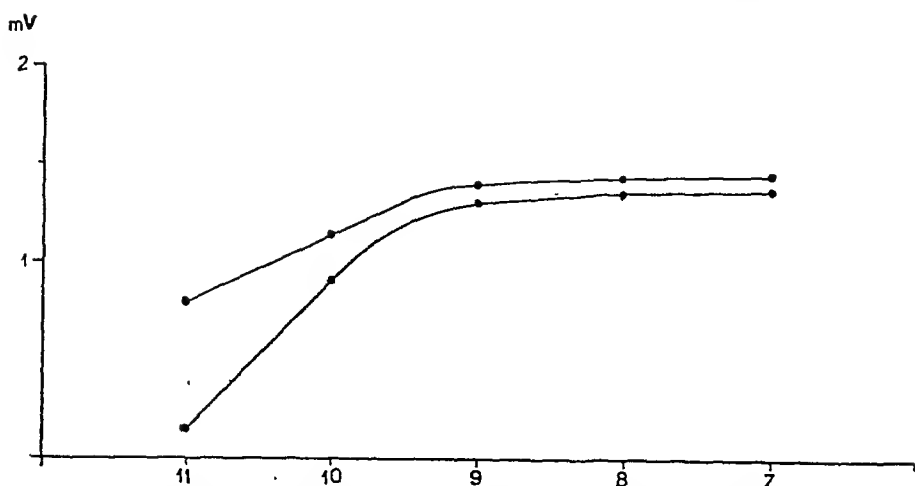


Fig. 7. Graphic representation of the increase in the positive (upper curve) and the negative (lower curve) component of the chorda electrogram as a function of increased strength of stimulation. The values for the relative size of the components and for strength of stimulation are taken from the curves in fig. 6 A. The ordinates for the upper curve represent the index for the size of the positive component in mV, the ordinates for the lower the index for the size of the negative component. The abscissa indicates the strength of stimulation expressed in coil distance.

increases. At the same time the negative trough that succeeds the initial positive wave, increases in parallel with the off-effect. The general level of the response after the secondary positive wave is also lower, the stronger the stimulus. This is shown still more clearly in fig. 6 B (p. 36).

It is therefore evident that increased strength of stimulation leads to an increase of both the positive and the negative component, but that the negative component comes to sight more easily in the electrograms obtained with stronger stimuli. The increase of the negative component sets in later (see fig. 7) but, once started, rises at a faster rate than the curve for the positive component.

As it was assumed (and will be proved later) that the off-effect was due to the negative component ending before the positive, the height (above the baseline) of the top of the off-effect can be regarded as an index of the size of the positive component. In the same way the difference in level between the position of the curve immediately after the secondary positive wave and the top of the off-effect can be regarded as an index of the size of the negative component. This presupposes that neither component is diphasic. That this is the case, will be shown later.

The ordinates for both the negative and the positive compo-

nents, measured in this manner from the curves of fig. 6 A (p. 35), were plotted in fig. 7 (p. 37) against coil distance in cm. The upper curve is the positive component, the lower curve the negative component. It is evident that with increased strength of stimulation the negative component increases relatively faster than the positive component. The curves also suggest the significant conclusion that increasing strength of stimulation actually leads to a maximum, which can be experimentally determined.

The electrograms obtained with maximal stimuli, determined in this manner, always followed practically the same course, namely the one, that has been described above as a normal chorda electrogram. The use of maximal stimulation was a fundamental prerequisite for experimental comparisons of any kind from case to case and independently of variations in the position of the stimulating electrodes. A suitable maximal stimulus, slightly above the limit, was therefore empirically determined in each experiment. Identical results were obtained with induction coil and Neon stimulator, the latter, of course, giving condenser discharges. (cf. MALTESOS and WEIGMANN, 1939).

The rate of secretion increased with strength of stimulation to the limit, above which the electrogram no longer altered, *i. e.* until the maximum had been attained. Further conclusions are not allowed from the limited number of experiments on secretion.

The stimulus artefact is probably one of the main reasons which in earlier work has prevented the purposeful use of maximal stimuli, and this circumstance has made the electrograms recorded exceedingly sensitive to the slightest change near the stimulating electrodes, such as minor disturbances in their position, drying etc. With slightly supramaximal stimuli the influence of such factors is obviously reduced to the practicable minimum.

The chorda electrogram as a function of strength of stimulation was also investigated systematically by BRADFORD (1887, 1888) and by v. HARREVELD (1930 a) who obtained results that were analogous to my own.

Considering that an increase in stimulus strength brings in a greater number of nerve fibres (ERLANGER, GASSER and BISHOP, 1924), it seems possible that the differences of the positive and the negative components with respect to strength of stimulation could be due to the negative component being activated by a group of high-threshold fibres which even may have different functional tasks in the gland. Stronger stimuli may also, as is well known, cause repetitive discharges in the individual nerve fibres (see *e. g.*

SCHAEFER and GÖPFERT, 1937). This may influence processes with different thresholds for acetylcholine (cf. LANGSTROTH, McRAE and STAVRAKY, 1938a).

#### 4. *Frequency of stimulation.*

The effect of frequency of stimulation on the chorda electrogram, as was to be expected, was that an increase in frequency compensated for a reduction in strength. The results are illustrated in fig. 8 (p. 40). — These results are not similar to v. HARREVELD's (1930 a).

The inhibited secretion, noted by WEDENSKY (1892) with greater frequencies, was not observed in the present work. Nor were such high frequencies employed that the phenomena referred to might have been expected to occur.

#### 5. *Repeated periods of stimulation.*

If stimulation of the chorda is repeated immediately after the response has descended to the baseline, an electrogram is obtained that differs from the previous one. But these differences are typical, regular changes, which become all the more distinct, the greater the number of electrograms recorded in immediate succession. Fig. 9 (p. 41) illustrates such a series of 5 electrograms. The most striking change is that the off-effect decreases. All the tops of the off-effects, however, lie at practically the same level above the baseline. The reduction in the extent of the off-effect thus consists in a reduction of its ascending branch. This is clearly due to the fact that the level of the curve after the secondary positive wave, lies higher above the baseline in each period of stimulation. The trough following the initial waves lies at a higher and higher level after each period of stimulation, while the peak itself is of approximately the same size in each case.

The decrease of the trough and the rise in the level to which it falls each time the stimulation is repeated, can only be explained by assuming that the negative component grows less and less with each repeated period of stimulation. The positive component is unaltered, which is evident from the fact that the initial peak and the top of the off-effect on each occasion attain the same height above the baseline.

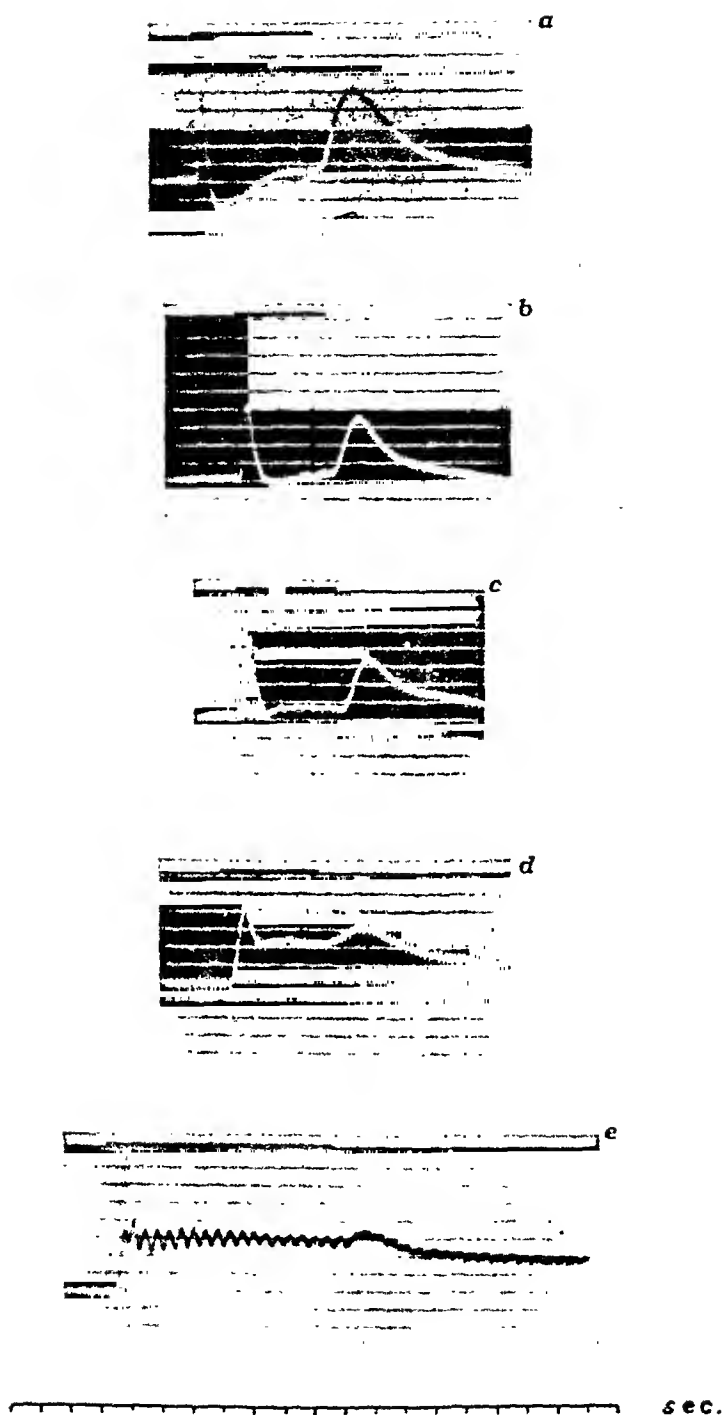


Fig. 8. Chorda electrograms for different frequencies of stimulation (condenser discharges). *a*, For about 40 per sec. *b*, About 20/sec. *c*, About 15/sec. *d*, About 5/sec. *e*, About 2.5/sec. In *e* the action potentials produced by the individual shocks no longer combine into a uniform curve.

It has already been described, how the negative component is gradually reduced in the course of prolonged chorda stimulation, while the positive remains fairly constant, at any rate during the first 25 seconds of maximal stimulation. This phenomenon must be identical with that reduction of the negative component which is observed in repeated stimulation. The latter phenomenon proves that the activated system requires a certain time for recovery.

In connection with prolonged stimulation it was observed that, if its duration exceeded the limit, at which no off-effect was obtained any longer, the positive component also began to decrease. The same phenomenon was observed with repeated periods of chorda stimulation.

In the experiments on strength of stimulation it was seen that, when strength of stimulation fell short of the maximum, the negative component was smaller and ceased more rapidly with prolonged stimulation, the lower the strength of stimulation was. The same thing was observed with repeated stimulation.

Fig. 10 (p. 42) depicts several periods of chorda stimulation repeated in close succession, the strength of stimulation being slightly submaximal. The curves show that, after the negative component had at first been reduced and then ceased, the positive also gradually diminishes on repetition until finally only an initial positive reduced peak remains. While the positive deflection decreases, its latency increases.

The apparatus for recording the secretion, did not allow continuous records of very prolonged rich secretion. There-



Fig. 9. Chorda electrograms with repeated periods of maximal stimulation. Calibration by 1 mV. (The electrograms indicate diminution of the negative component on repeated stimulation).



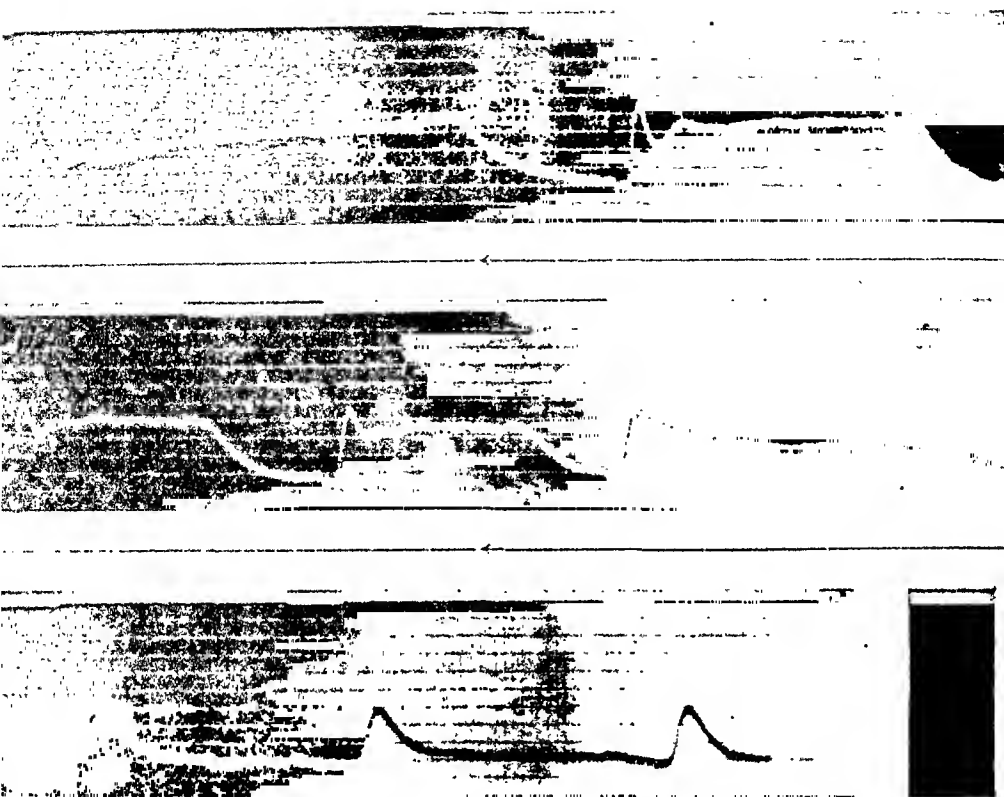


Fig. 10. Chorda electrograms with repeated periods of submaximal stimulation. Calibration by 0.5 mV. (The electrograms indicate diminution first of the negative, later of the positive component).

fore the latter was not recorded on the film in these experiments, but was only observed. The secretion decreased in parallel with the positive component.

Experiments made by HOLZLÖHNER (1931) show that exhaustion of the secretion by means of repeated chorda stimulation takes place within periods of about the same length as those, within which the electrogram was almost gone in the present work.

Chorda electrograms recorded in close succession displayed differences. Therefore it was important to know, how long a time the gland required for recovery, so that an electrogram similar to the previous one could be obtained. This time differed according to the degree of «exhaustion» of the preparation. After stimulation had proceeded so far that only a simple positive wave was obtained with repeated periods of excitation, a normal electrogram could be obtained after a pause of 1—1.5 min. In the experiments, in which other factors were varied, the intervals between two periods

of stimulation always exceeded 1 minute, if the preceding stimulation had been short, and 2 minutes, if it had been long (over 10 sec.).

It has already been mentioned in connection with the description of the effect of the duration of stimulation that, if an experiment lasted many hours and the chorda had been stimulated for an hour or more, the negative component towards the end of the experiment had experienced a reduction which was not reversible for at least several hours. The size of the positive component and the rate of secretion are, however, at the end of the experiment much as in the beginning.

V. HARREVELD (1930 a) also made the observation that repeated periods of stimulation led to a reduction of the component that is here called the negative one. According to him, this phenomenon did not occur, when the intervals of stimulation exceeded 2 minutes.

— If, on the other hand, stimulation is repeated before the curve has fallen to the baseline, i.e. while an off-effect is in progress, a phenomenon can be noted, which was of great importance for the analysis of the two components of the electrogram.

When stimulation is started on the top of an off-effect, the latter is rapidly depressed by a negative potential with a latency of about 0.3—0.4 sec. (see fig. 11 a, p. 44). The negative depression descends to the level of the negative trough of the ordinary electrogram. This negative depression is only sometimes succeeded by a small secondary positive wave. After the first 2 sec. of stimulation the course of the electrogram is as usual.

These phenomena were observed neither by GAYDA (1924) nor V. HARREVELD (1929, 1930), the only ones who had previously mentioned off-effects in chorda electrograms. A similar phenomenon had, however, been previously discovered in the electroretinograms. It was first noted by EINTHOVEN and JOLLY (1908). GRANIT and RIDDELL (1934) found that, when the eye was exposed to renewed illumination during an off-effect, the negative deflection in the electroretinogram was due to reintroduction of the negative component. That this is also the case with the corresponding phenomenon in the chorda electrogram, is proved by the results of experiments which will be described.

The negative depression following stimulation on the top of an off-effect always varies in parallel with the height of the ascending branch of the off-effect. This ascending branch has already been recognized as an index of the size of the negative component at the moment of cessation of stimulation. As will be proved later,

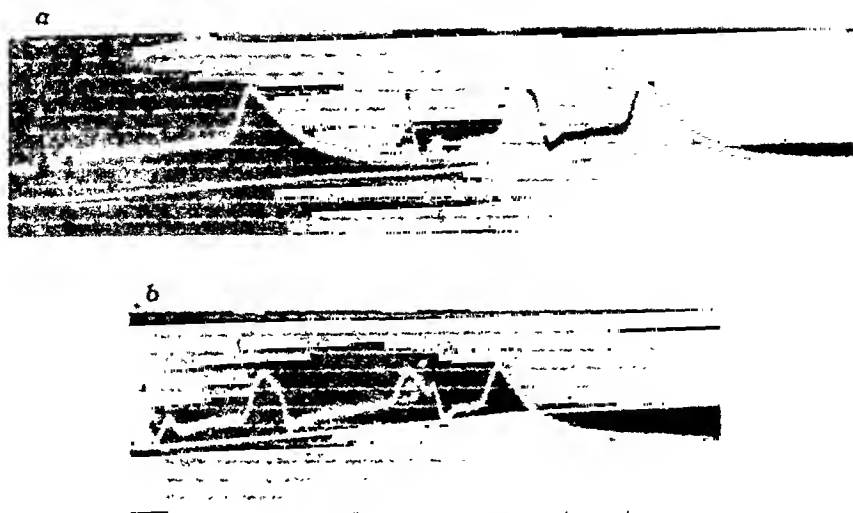


Fig. 11. Chorda tympani stimulation repeated during off-effect. *a*, Repeated stimulation on the peak of the off-effect (third period of stimulation). *b*, Repeated stimulation on descending branch of the off-effect (third period of stimulation).

the descending branch of the off-effect is dependent on the decrease of the positive component of the electrogram. If renewed stimulation followed in this part of the off-effect, a small initial positive wave could be expected to precede the negative depression. Fig. 11 *b* shows that this is, indeed, the case. The small initial positive peak attains the same level above the baseline as the corresponding phase of the response to the first stimulation. — Chorda stimulation may also be repeated immediately after cessation of stimulation in a case, in which no off-effect is obtained, *e.g.* after weak or prolonged stimulation. Then no negative depression whatever is observed.

Experiments with repeated stimulation on top of an off-effect were made in about 20 cases and the results were very uniform.

CANNON and CATTELL (1916) stimulated the chorda during the time that pilocarpine secretion was proceeding. By injecting pilocarpine they obtained a fairly flat and simple type of response of positive sign. If a chorda stimulation was introduced, they sometimes found a quick depression of the pilocarpine curve. These authors were unable to offer any explanation of the phenomenon which they called «reversal of the sign of the response». — It must be considered a probable explanation of it that in such cases the pilocarpine mainly activated the positive component, while the negative remained more or less latent. When chorda stimulation was

introduced, the relatively intact negative component was also activated and depression of the curve resulted.

GRANIT (1933) and GRANIT and THERMAN (1934, 1935) found that activation of the negative component in the electroretinogram in an off-effect was coupled with inhibition. The impulses in the optic nerve stopped or decreased in frequency, when the negative deflection appeared. An ordinary off-effect is connected with an increased discharge of impulses in the optic nerve. — Owing to the great similarity between the chorda electrogram and the electroretinogram, it did not seem impossible that the negative component in the former also had to do with inhibition of the secretion. LANGLEY (1890) and DALE and LAIDLAW (1911—12) believed that there were fibres in the chorda which inhibited secretion, as they had observed an after-secretion in animals poisoned with nicotine and cytisine, which was stronger than the secretion elicited during stimulation.

If the negative component of the chorda electrogram were connected with inhibition of the secretion, the off-effects might have been expected to go with an increased rate of secretion. It has already been stated that the reverse is the case (see fig. 4, p. 27). Activation of the negative component on top of an off-effect afforded an opportunity of studying its relation to the rate of secretion. As fig. 11 shows, the reintroduction of this component is not accompanied by any reduction of the rate of secretion. On the contrary, the latter slightly increases. On the basis of these facts and from the experiments with chorda stimulation during sympathetic stimulation (to be described below, p. 76), it would seem that the negative component of the chorda electrogram is not connected with inhibition of the rate of secretion of the gland. On the other hand, one should realise that the rate of secretion may not be the best definition of what actually happens, when the negative component potentials are activated.

### 6. *Different leads.*

All the electrograms reproduced in this work were recorded in the same standard leads, one of the electrodes approximately in the middle of the outer surface of the gland, the other one in the decerebration wound. Other leads for the chorda electrogram were examined in 10 experiments.

From different points near the middle of the outer surface of the gland the response was always the same, also when small silver-

pins were used and when the contact surface between the gland and the electrode was greater than 1 cm<sup>2</sup>. The other, indifferent electrode, could be placed on subcutaneous tissue in any part of the body. With the different electrode as little as 1 mm from the gland no changes of potential whatever could be recorded.

Greater shifts of the gland electrode did exercise a slight influence on the chorda electrogram. Thus the depression after the initial peak and the off-effect marking the relative size of the negative component were greater, if the electrode lay near the edge of the outer glandular surface. The hilus as a place for the indifferent electrode had to be avoided, as it sometimes happened that this region did lead off from the gland and thus could not be regarded as indifferent, though in the majority of cases it may well have been so. It can scarcely be assumed that an electrode placed near the hilus can lead off possible changes of potential in the surfaces of the glandular cells that are turned towards the lumen.

The «two-gland-lead» of GESELL (1918—19 a) could not be considered suitable, as a humoral effect on the other gland has to be taken into account.

The regular orientation of the glandular cells in relation to the glandular lumen must be a significant factor in determining the electrogram. This factor has been discussed by most of the workers in this field (see e.g. v. HARREVELD, 1930 c).

The changes of potential must be due to the co-operation of a large number of elements orientated in the same direction. My experiments have shown that the size of the contact surface between the electrode and the gland exerts no influence on the electrogram. The same electrogram was obtained, even if a silver chloride pin with a very small conducting surface in its tip was inserted between two glandular lobes without piercing the tissue. However, the electrogram was greatly altered, if this pin was inserted into the glandular tissue itself.

This fact indicates that the potentials arise in parallel in every point of the outermost layer of the glandular tissue close to that pole of the gland which is opposite to the hilus. Whether the cellular elements that produce the recorded potentials are only those at the surface of the gland tissue (including the interlobular surfaces) or all the cells of the gland, is difficult to say.

The resting potential of the gland could not very well be measured with my apparatus.

### 7. *Other factors that might be expected to exercise an influence on the electrograms.*

Before most of the experiments the test animals were starved for about 20 hours, but 6 cats were allowed an ample meal previous to the experiment. In these experiments, however, the type of the electrograms proved to be normal. The ether anaesthesia used for decerebration often caused powerful salivation. The experiments, in which the animals were allowed to consume food, were therefore of value only as controls. The fact that the normal electrograms were alike, although the salivation due to the narcotic varied very much (chloroform was also used) in the different experiments, indicates that this salivation did not affect the electrophysiological results. Besides, JÄRVÄ (1939) has found that the histological picture of the glandular cells remains unchanged, even after considerable consumption of food.

In some experiments, in which the test animal was in a state of severe shock owing to the effects of the operation and loss of blood, it was found that this had no influence on the electrophysiological results.

### C. *Atropine.*

As pointed out in the historical section, most authors (see *e.g.* v. HARREVELD, 1930 a) have seen that small doses of atropine tended to reverse the electrical sign of the response. Larger doses suppressed it altogether. v. HARREVELD (1930 a) found that it was often difficult to choose doses of atropine eliminating only one of the components. The results of the earlier atropine experiments were in favour of the opinion expressed already by BAYLISS and BRADFORD (1887), that the response consisted of two components of opposite sign.

The atropine experiments in the present work yielded practically the same results as those of v. HARREVELD (1930 a). There were 10 of them and they were all performed on cats. — Fig. 12 a (p. 48) illustrates the appearance of the chorda electrogram approximately 2 minutes after the intravenous injection of 0.3 mg of atropine sulphate. The electrogram consists of a practically pure negative component. The latency is about 0.4 sec. The same latency was obtained for the negative component in repeated stimulation during an off-effect. After having fallen comparatively swiftly about 1.5 mV below the baseline, the electrogram in fig. 12 a

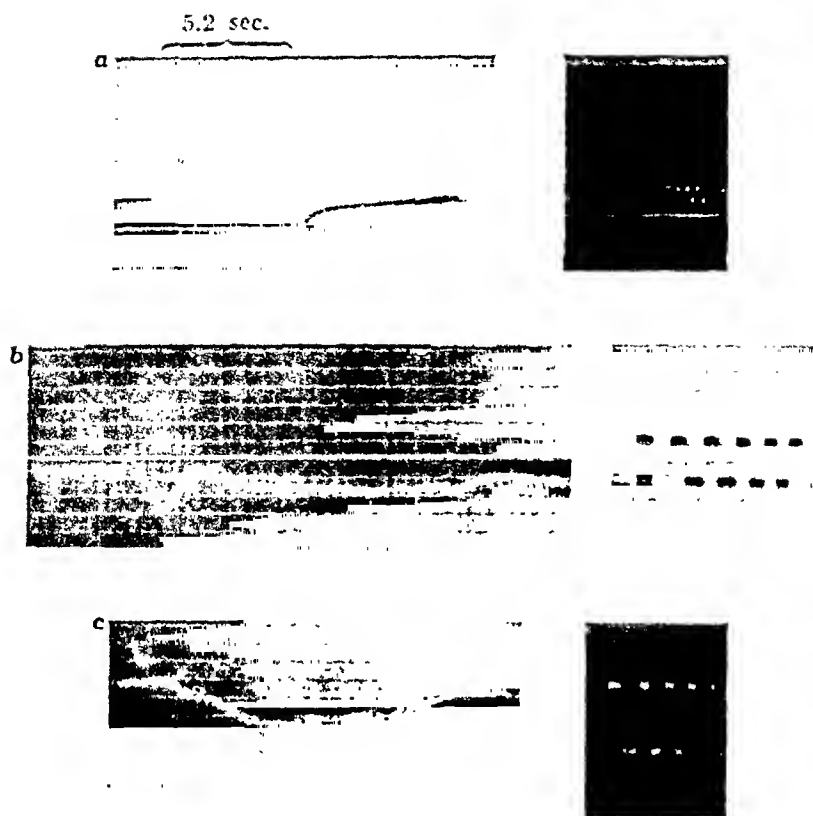


Fig. 12. Elimination of the positive component of the chorda electrogram by small doses of atropine in 3 experiments. *a*, Chorda electrogram after intravenous injection of 0.3 mg atrop. sulph. Calibration by 0.5 mV. *b*, Chorda electrogram after injection of 0.1 mg atrop. sulph. Calibration by 1 mV. *c*, Chorda electrogram after injection of 0.16 mg atrop. sulph. Calibration by 0.5 mV.

follows a very slowly ascending course, on which some small waves are seen during the first few seconds. When the stimulation is interrupted, the curve again rises towards the baseline fairly rapidly. This ascent must be regarded as corresponding to the ascending branch of the off-effect in the normal electrogram.

No visible secretion could be obtained after the positive component had been eliminated by atropine. The positive component is therefore more directly connected with a visible flow of saliva, such as can always be noted during its activation.

v. HARREVELD's (1930 a) observation that it is often difficult to find the dose of atropine which removes the positive component and leaves the negative intact, was confirmed. Fig. 12 b illustrates the chorda electrogram in another atropine experiment

after the injection of 0.1 mg of atropine sulphate. In this electrogram the positive component is only partially extinguished. In accordance with this the stimulation, too, only produced a scanty, though perfectly definite secretion. Fig. 12 c shows a chorda electrogram in a third atropine experiment after the injection of 0.16 mg of atropine sulphate. In this experiment this dose not only extinguished the positive component, but the negative also is greatly reduced and retarded. The different animals displayed a variable resistance to atropine dosed per kg bodyweight. — After atropine the negative component that was produced, disappeared more rapidly in case of prolonged and repeated stimulation than the negative component in a normal electrogram.

v. HARREVELD (1930 a) states that, in case of increasing doses of atropine, first the positive component, then the secretion and finally the negative component is eliminated. In the present work the positive component in all the atropine experiments ceased at the same time as the secretion. With the dose slightly increased, the negative component also disappeared.

— The influence of atropine on the sympathetic electrogram will be dealt with below (p. 68).

#### D. Eserine.

The influence of eserine on the changes of potential in the submaxillary gland has not been investigated previously. However, CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 a) examined the action currents during pilocarpine secretion. In both works these electrograms are described as resembling the chorda response, but with a slightly more monophasic and protracted course. CANNON and CATTELL found that chorda stimulation during pilocarpine secretion did not as a rule affect the electrogram. But there were exceptions in which the phenomenon already described, which they called »reversal of the sign of the response», occurred.

In view of certain well-known effects of eserine an analysis with the aid of this substance was held to be of importance. An examination of the effect of doses that do not produce secretion seemed to be of particular interest.

Fig. 13 a (p. 50) reproduces a chorda electrogram 10 min. after the intravenous injection of 0.5 mg of eserine salicylate. This injection by itself, *i.e.* without stimulation of the nerves, produced no visible salivary secretion whatever. The duration of stimulation in the electrogram is 3.5 sec. during which time the curve does



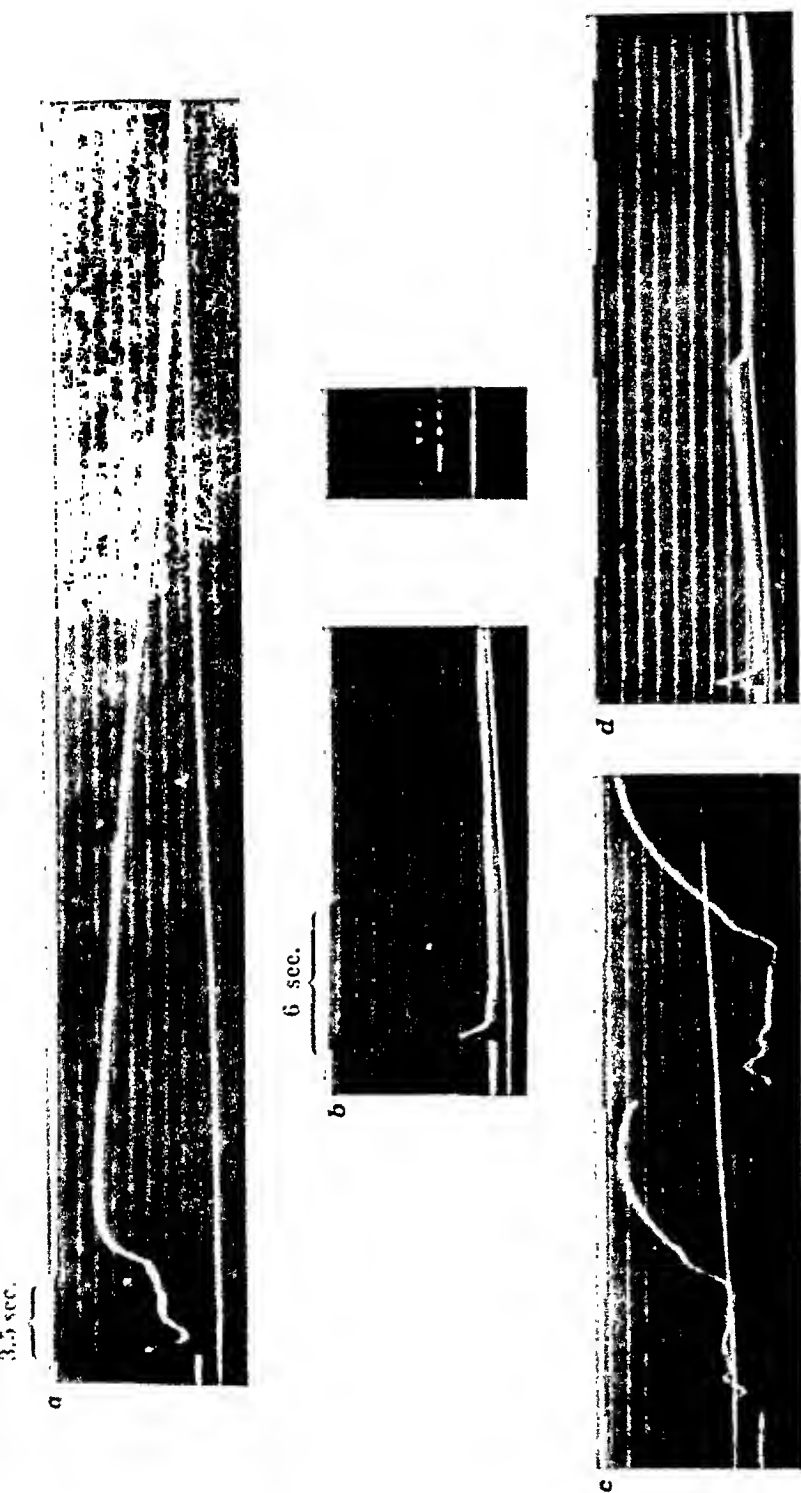


Fig. 13. Chorda electrograms after intravenous injection of eserine. — *a*, 10 minutes after injection of 0.5 mg of eserine salicylate. *b*, 40 minutes after 0.5 mg of the drug. Calibration for *a* and *b* by 1 mV. *c*, Chorda electrogram after injection of 0.5 mg eserine salicylate. A new chorda stimulation was introduced on the off-effect. *d*, Chorda electrogram during late eserine action. The negative depression on repeated stimulation corresponds to the slight rise between cessation of stimulation and renewed stimulation.

not differ from the normal. The rising phase of the off-effect also coincides with what would have been its size and place in a normal electrogram. It is not until the off-effect has reached its maximum that the effect of eserine, somewhat surprisingly, causes a long plateau at the level of the off-effect, finally to descend slowly to the baseline in the course of about 50 seconds. It is no less remarkable that this greatly prolonged off-effect is accompanied by an equally prolonged and very powerful after-secretion from the gland.

The prolonged after-secretion in chorda stimulation after small doses of eserine seems previously to have been observed only by MALTESOS and WEIGMANN (1939), who found that the most conspicuous influence of eserine on the course of secretion in chorda stimulation was a very much increased and prolonged after-secretion. Secretion during stimulation was also increased, but pursued the same course as before eserine. According to these workers, the after-secretion increased to figures that were 54 times higher than normal. MALTESOS and WEIGMANN found the threshold of the chorda unchanged after eserine.

These observations concerning the effect of eserine on secretion during and after chorda stimulation agree very well with my own eserine experiments which were 7 in number. They all gave similar results.

The interpretation of the effect of eserine, illustrated in fig. 13 a (p. 50) must be that the negative component of the electrogram was not affected by the poison, while the positive component was greatly prolonged. We will fill out the details of this argument below. These long off-effects must be considered to represent the positive component in its pure form, in the same way that the chorda electrogram after small doses of atropine represents the pure negative component. — That the long eserine off-effects coincide with a strong after-secretion, confirms the observation that the positive component is intimately connected with a distinctly visible flow of secretion.

Fig. 13 b (p. 50) shows the chorda electrogram in the same experiment, in which the curve of fig. 13 a was recorded, but 40 minutes after the eserine injection. This curve is typical of later effects of eserine, which can be accelerated by using stronger doses of the drug (1 mg). The off-effects then entirely fail to appear and the response rises after cessation of stimulation very slowly in direct continuation of the rise initiated during stimulation of the nerve. The rate of secretion is not changed for many seconds

after cessation of stimulation. The secretion is roughly similar, both in fig. 13 a and 13 b. In fig. 13 b, however, the eserine has also affected the negative component, so that neither of the components decreases quickly, but both continue after cessation of stimulation. This has resulted in a failure of the off-effect to appear.

We already know what happens, if the chorda be stimulated afresh during a normal off-effect (p. 44). Fig. 13 e represents an electrogram recorded after the injection of eserine, chorda stimulation having been interposed into the long eserine off-effect. In the same way as in an ordinary electrogram, stimulation rapidly depresses the off-effect by reintroducing the negative component. Fig. 13 e shows plainly that the introduction of the negative component is also connected with an increase in the rate of secretion. This increase was always present. Fig. 13 c shows, besides (cf. fig. 25, p. 75), that eserine not only prolongs the duration of the response after stimulation has been discontinued, but also enhances both components. This is evident from the large dimensions of the off-effect and from the extent of the negative component in fig. 13 c. This fully agrees with the statement of MALTESOS and WEIGMANN (1939) that not only the after-secretion, but also the secretion during stimulation was increased by eserine.

It is evident from fig. 13 d, too, that the difference between the off-effects of figg. 13 a and 13 b is due to the return of the negative component towards the baseline, *i.e.* the rising phase of the off-effect in the latter case having been prolonged and slowed down by the effect of eserine. In fig. 13 d stimulation was repeated twice during after-secretion. Now we have seen that re-excitation during an off-effect reintroduces the negative component. The small negative component activated on the off-effect in the heavily eserinated gland of fig. 13 d, shows how little the off-effect has risen in the interval between the periods of stimulation or, in other words, how slow the return of the negative component towards the baseline has been.

The eserine experiments demonstrate that the positive component must be intimately connected with a visible flow of saliva. In contrast to the atropine experiments, however, they also show that the negative component seems to have some connection with the processes of secretion. It should be mentioned that the phenomenon which CANNON and CATTELL (1916) called the «reversal of the sign of the response» was also accompanied by an increased rate of secretion.

### E. Compression of the carotids.

By compression of the carotid vessels of the experimental animal GRANIT (1933) succeeded in eliminating the rapid positive component in the electroretinogram of cats. As this method proved to be an effective instrument in analysing the electroretinogram, it was natural to try it on the chorda electrogram too.

The effect of blocking the carotids on the chorda electrogram had been investigated by CANNON and CATTELL (1916), GESELL (1918—19 c, 1920—21 a) and v. HARREVELD (1930 c), but the results of this test had been contradictory.

The effect of carotid compression was investigated in 6 experiments, and the shutting off of the carotid blood supply was repeated several times in each experiment. — When the chorda is stimulated after blocking the carotids, at first, in entire agreement with v. HARREVELD's (1930 c) statement, an electrogram is obtained which is within the limits of the variations of a normal electrogram. If, however, the stimulation is repeated after the off-effect has passed, the electrogram is altered in a manner that does not correspond to the change which has been described for repeated stimulation with open carotids (p. 39). Then the negative component was first reduced. Now with closed carotids repeated stimulation led to a still more rapid reduction of the positive component. Whereas ordinarily a reduced, but purely positive component is finally obtained, the final result after carotid compression is a reduced, but purely negative component. In both cases the electrograms are alike to begin with.

Fig. 14 a (p. 54) illustrates two successive periods of stimulation with open carotids. In the second period of stimulation the reduction of the negative component is already clearly visible. Fig. 14 b shows the final result of several excitatory phases immediately after those in fig. 14 a.

Fig. 14 c represents two successive periods of stimulation after closing the carotid supply. The first curve is similar to the first curve in fig. 14 a. The second curve in fig. 14 c, however, displays definite reduction and retardation of the positive component. Especially noticeable is a great reduction of the initial positive peak, whereas the secondary positive wave is slightly increased. This must be assumed to indicate a retardation of the course of the positive component. Besides, the latency of the latter is slightly prolonged. Fig. 14 d illustrates the final result of some repeated periods of stimulation following those shown in fig. 14 c.

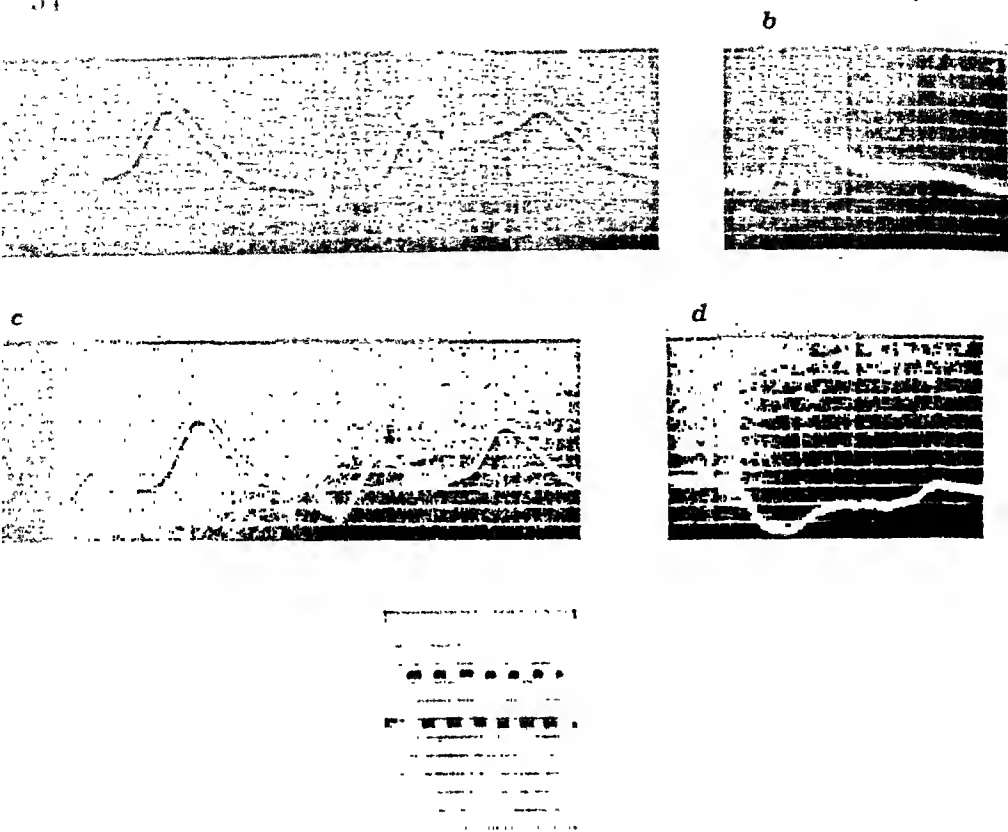


Fig. 14. Influence of compression of the carotids on the chorda electrogram elicited by repeated periods of stimulation. *a*, Repeated stimulation with open carotids. *b*, Final result of continued repetition after the periods of stimulation in *a*. *c*, Repeated stimulation with compressed carotids. *d*, Final result of continued repetition after the periods of stimulation in *c*. — Calibration by 1 mV for *a*—*d*.

Thus the effect of compression of the carotids on the chorda electrogram is as follows: The normal chorda electrogram is obtained from an «unexhausted» preparation with periods of stimulation shorter than 10 sec. But upon prolonged or repeated excitation the positive component is retarded and suppressed relatively more than the negative one which behaves in an approximately normal fashion. — Owing to these circumstances the positive component can be eliminated from the electrogram by repeated periods of stimulation with closed carotids before the negative one, so that an electrogram is obtained which consists of a pure, but somewhat reduced negative component.

— The course of secretion was recorded in some of the experiments. It could again be established that the flow of saliva de-

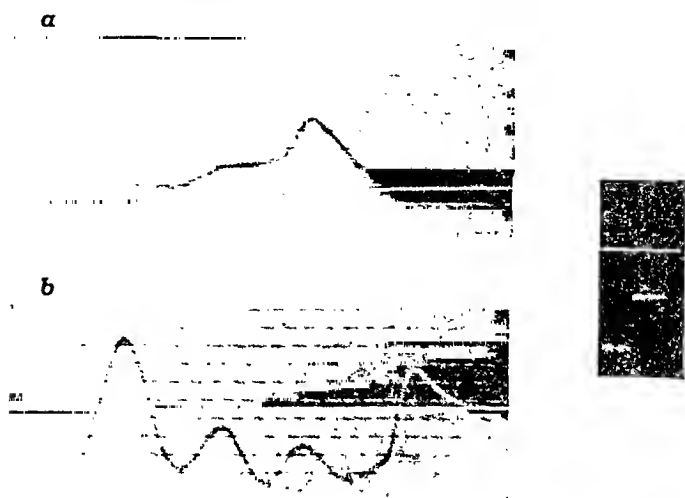


Fig. 15. Influence of compression of the carotids. *a*, Control curve in chorda stimulation (5.2 sec.) with open carotids. *b*, Chorda electrogram recorded after some repeated periods of stimulation with compressed carotids. — Calibration by 1 mV for *a* and *b*.

creases in parallel with the positive component, and when only a negative component is left, no flow of saliva can be observed.

Fig. 15 *a* shows a normal chorda electrogram and at the same time the course of secretion. Secretion is comparatively good. Fig. 15 *b* represents a chorda electrogram in the same experiment after some repeated periods of stimulation with closed carotids. In this electrogram the positive component is greatly reduced compared with the negative one. The initial positive peak does not appear, but the prolonged latency and retarded ascent of the positive component cause the electrogram to start with a negative deflection and the secondary positive wave to be greatly enlarged instead. It is evident from the secretion record that secretion is much reduced in comparison with fig. 15 *a* and that it also comes later. Fig. 15 *b* also shows the usual tendency of the gland to give electrograms with rhythmical waves after compression of the carotids.

#### F. Algebraical summation of the chorda electrogram of two components.

Most of the workers, who investigated the electrical response of the submaxillary gland, assumed that the chorda electrogram was composed of at least two components of opposite electrical sign (see Historical review and The problems p. 22).

Though V. HARREVELD (1930 b and c) can be said to have clearly realized the significance of an important factor such as the gland resistance, it can nevertheless be stated that he did not take the final steps in his choice of apparatus that would have led to a great simplification of his complex scheme with 5 components of the glandular response, two of them being due to the »action current in a restricted sense».

ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT (1933) did so, and are the only ones, who have previously recorded these glandular action potentials with a swiftly reacting instrument through the high internal resistance of amplifier valves, in relation to which the changes of resistance in the gland should be insignificant. Their work, however, did not go much beyond a note on some observations, which led them to conclude that the chorda electrogram was formed of a »quick component» and a »slow component». They do not mention components of opposite sign.

The main criticism directed against older work has been (i) that large variations of resistance in the gland led to serious distortion of the true action potential, and (ii) that this in combination with the use of uncontrollable submaximal stimuli has made almost any complex curve possible, at the same time reducing the analytically important off-effects to the rank of insignificant irregularities.

In spite of this, it can, however, be considered proved by earlier investigators that the chorda electrogram originates by means of an interference between at least two components of opposite potential sign. This is supported especially by the early experiments with atropine. My work along these lines with different selectively acting agents put this conclusion beyond doubt.

GRANIT (1933) carried out an analysis of the components of the very similar electroretinogram by analogous methods. He points out that the removal of certain parts of the electroretinogram by biological methods enables different components in it to be distinguished, which have their cause in different processes in the retina.

— As already stated, the change of potential during chorda stimulation that makes the surface of the gland more electronegative, is eliminated after a small dose of atropine. Instead of an ordinary electrogram a comparatively simple response is obtained, here called a negative component and recorded downwards, but actually consisting in a decrease of electronegativity of the surface of the gland (fig. 12 a, p. 48). This electrogram displays an un-

mistakable similarity to the negative trough in the normal electrogram (fig. 4, p. 27) between the initial peak and the top of the off-effect. This is taken to mean that the negative atropine electrogram is a component of the normal electrogram, superimposed in the latter on one of opposite sign.

The component that remains after a small dose of atropine has been called the negative one owing to the great likeness of the chorda electrogram to the electroretinogram. The existence of this component is further proved by the fact that it could be obtained in a pure, though reduced form by means of repeated periods of stimulation after closing the carotids (fig. 14, p. 54). The fact that the slow ascent after the initial changes of potential in the normal chorda electrogram is due to a reduction of the negative component, is further proved by this component clearly displaying the same property, when it has been isolated, *e.g.* by atropine.

No agency was found that selectively removed the negative component, while leaving the positive intact. On the other hand, a pure positive component could be obtained by certain other methods. — Fig. 16 illustrates an electrogram recorded in the case of weak chorda stimulation which after several repetitions gives a curve consisting of a practically pure positive deflection taking a simple course. This latter curve is probably a chorda electrogram consisting of a practically isolated positive component.

As it was possible, therefore, to isolate from the electrogram a positive and a negative component which in all probability are based on different processes in the gland, the question arises, whether the complex «normal electrogram» can be explained as



Fig. 16. Chorda electrogram during weak stimulation. After some repeated periods of stimulation a practically pure positive component with a horizontal course is obtained.



being composed of *only* these two components. If this is the case, the algebraic sum of a chorda electrogram that consists of a pure positive component, and one that consists of a pure negative component, should have the appearance of a normal electrogram.

In order to obtain a sum of two electrograms, each of which consists of an isolated component, it is essential that each of the components should have altered in a similar manner in being isolated. It is also essential that they should have been recorded in the same experiment, as varying size of the gland may cause differences in the electrograms which would render algebraical summation difficult. These conditions are fulfilled by the electrograms in fig. 14 b and 14 d (p. 54). The former, as already mentioned, is a chorda electrogram consisting of a pure positive component, though slightly retarded and reduced by repeated stimulation. The latter, obtained with closed carotids, consists of a purely negative component, also influenced in the same way by repeated stimulation. These electrograms have, besides, practically the same duration of stimulation, which, of course, is necessary in order to obtain a reliable algebraical summation.

Fig. 17 a (p. 59) shows the two electrograms in figg. 14 b and d (the thinly drawn curves) and their algebraic sum (the thickly drawn curve). Before the summation the original films were magnified so that 1 sec. corresponded to 5.4 cm on the film. Fig. 17 b is an ordinary chorda electrogram recorded in the same experiment. This electrogram consists of all the phases of the normal electrogram. If this chorda electrogram is compared with the middle curve in fig. 17 a, which, as stated, represents the algebraic sum of the two pure components, it is clear that the two curves are sufficiently alike for the complex normal electrogram in chorda stimulation to be explained as being composed of only the two comparatively simple components.

The derivation of the initial positive wave is seen in fig. 17 a. Partly it arises owing to a difference in latency between the two components, but principally it is due to the positive component having a more rapid rate of rise than the negative one, so that the former overtakes the latter at first. The negative continues to increase after the positive has attained its maximum, a circumstance that causes the negative drop that succeeds the initial positive peak.

The frequent, but rather varying secondary small positive wave can also be explained by fig. 17 a. As is often the case, when the individual components have been isolated, they may often have a maximum during the first second of stimulation, even when they

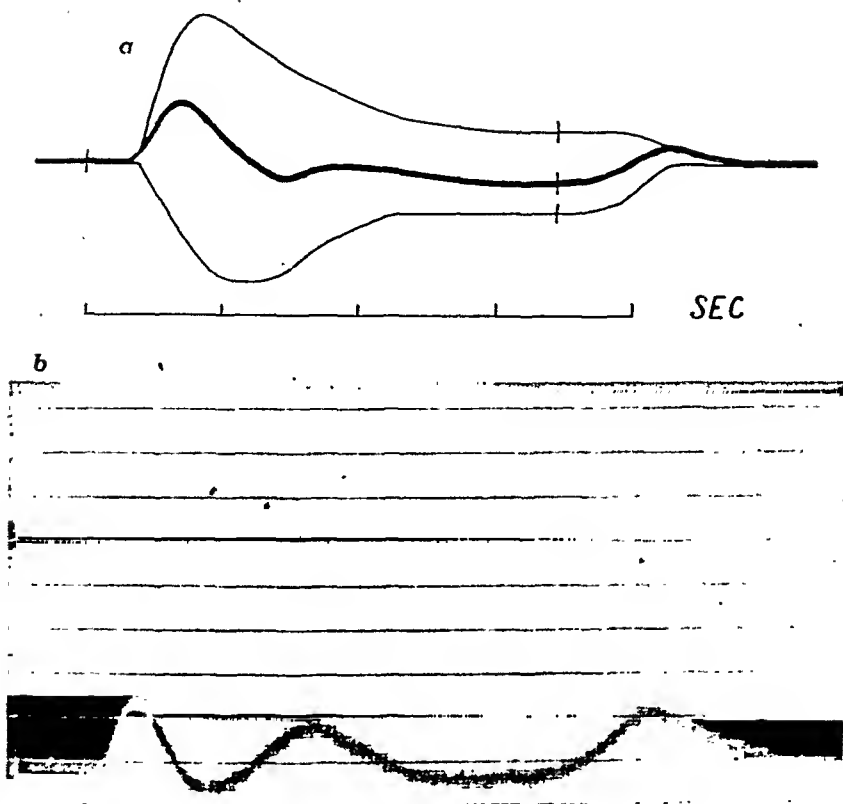


Fig. 17. Formation of the chorda electrogram of a positive and a negative component. *a*, Algebraical summation of the chorda electrograms in fig. 14 *b* (= the upper, thinly drawn curve) and fig. 14 *d* (= the lower, thinly drawn curve). The thickly drawn curve = the algebraical sum of the two electrograms, each of which represents an isolated component. *b*, Ordinary chorda electrogram from the same experiment as the curves in fig. 14.

are contained in the normal electrogram, and then continue a comparatively horizontal or slowly changing course. Different velocities in this fall from the maximum of the different components may be assumed to cause the secondary positive wavelet. This wave, however, is sometimes succeeded by one or two smaller waves.

It is also proved by fig. 17 *a* that the off-effect is due to the negative component returning to the baseline earlier than the positive.

— Sometimes there is a succession of rhythmically waxing and waning waves on the electrogram. This is seen in fig. 18 (p. 60). This figure represents a chorda electrogram that becomes rhythmically fluctuating during stimulation. In repeated stimulation after compression of the carotids such rhythms are very often



Fig. 18. Rare type of chorda electrogram with waxing and waning rhythmic waves.

seen (fig. 15, b, p. 55), though they usually disappear, when a purely negative deflection is obtained. This indicates that the positive component alone or interaction between both components is responsible for the rhythm. What could be the cause of such rhythms?

ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT (1933) also observed that sometimes the chorda electrogram as well as the responses that were obtained with pilocarpine became rhythmically fluctuating. On the basis of these observations they assumed that the electrograms arose from the summation of numerous brief components.

Now, rhythmically fluctuating processes are quite common in the nervous system, and it is, of course, possible that the rhythms originate in processes on the «nerve-side» of the nerve-gland preparation (see *e.g.* SCHAEFER, 1940). Such processes could drive the gland rhythmically. This would be an alternative to the explanation suggested by ROSENBLUETH, FORBES and LAMBERT (1933). On the other hand, it is possible that secretion can take place by synchronized activity just as processes do in the ganglions.

But there is a third important possibility which cannot be neglected. This is that the waves may be caused by rhythmic activity in the blood vessels

which could thus produce the driving force, above alternatively ascribed to the nervous mechanism including the locus sensitive to pilocarpine. In favour of this point of view the fact must be emphasized that compression of the carotids both affects the positive component and also easily induces rhythmic activity in the glandular potential and that stimulation of the sympathetic is particularly prone to cause periodic waxing and waning waves in the electrogram (*cf.* fig. 19 b, p. 63).

— The analysis, which enables the complex chorda electrogram to be divided into two components, is confirmed by several facts and phenomena. The question, as to whether the off-effects are wholly due to the negative component swinging back more rapidly after cessation of stimulation than the positive one, is of particular interest. In the electroretinogram only 50 % of the off-effect could be explained in this manner, among other things because only one half of the off-effect is removed by renewed stimulation (GRANIT and RIDDELL, 1934; GRANIT and THERMAN, 1937). In the chorda electrogram the off-effect is completely cut down by renewed excitation as has already been described. This confirms the conclusion in a valuable manner that the off-effect must be due to the known components approaching the baseline from opposite sides with different speed after stimulation has ceased, and not to an increase of the positive component or to any independent positive component. It is most important from this point of view that when stimulation is superimposed on the off-effect, the latter is always depressed to immediately below the level, at which the string lies just before the rise of the off-effect. This must therefore mean that the rising branch of the latter is due to the swing-back of the negative component, which can also be re-introduced a second time by renewed stimulation.

It would seem necessary to explain, why the height of the off-effect varies in relation to the initial peak. In the middle curve in fig. 17 a (p. 59), which was obtained by adding up the two individual components, the top of the off-effect is lower than that of the initial peak. This is due to each of the components having a comparatively high maximum during the first second of stimulation, while at the end of it the height of each of them is considerably lower. In other cases, however, the individual components follow a comparatively horizontal course immediately after their having been activated (cf. figg. 16 and fig. 12 a), and then the maximum during the first second is not so pronounced. In such cases the maximum of the off-effect of the complex electrogram lies higher than that of the initial peak.

When describing the changes of the chorda electrogram due to a variety of different factors, the effect of these variations on the individual components was also studied. The conclusions then reached and my analysis of the components mutually confirm each other. Further support for it will follow from experiments to be described below, in which interaction between the chorda and the sympathetic has been analysed.

## V. Action potentials of the submaxillary gland of cats during stimulation of the sympathetic.

BAYLISS and BRADFORD (1887) found that the action currents of the gland elicited by the sympathetic were different for dogs and cats. It has been pointed out above that the results and conclusions reached for the chorda electrogram of cats also apply in principle to that of dogs. The observation by BAYLISS and BRADFORD with respect to sympathetic electrograms of cats and dogs will be confirmed below. While results with regard to the chorda electrogram could very well be compared with those of earlier authors, the sympathetic electrogram of cats, which has not been extensively investigated before except by BAYLISS and BRADFORD and by CANNON and CATTELL (1916), cannot be compared with the sympathetic electrograms of other earlier investigators, which were recorded from dogs.

### A. The normal sympathetic electrogram of cats.

The sympathetic electrograms of cats were recorded in 18 experiments. The course of the sympathetic response in different experiments was not quite as constant as that of the chorda electrogram. Besides, the sympathetic electrogram in the same experiment showed variations, the cause of which could not be ascertained. But the variation in the blood supply is one important complication that accompanies sympathetic stimulation and we will show below that it should be given serious consideration.

Although some variations occurred, it was possible to establish a fundamental type of sympathetic electrogram of cats. This fundamental type was secured in more than 10 experiments, including all those experiments, in which simultaneous stimulation of both the chorda and the sympathetic was tried. The course of a typical sympathetic response is seen in fig. 19 a (p. 63). The electrical sign of a sympathetic response of cats is the same as in the chorda electrogram, *i.e.* the surface of the gland becomes

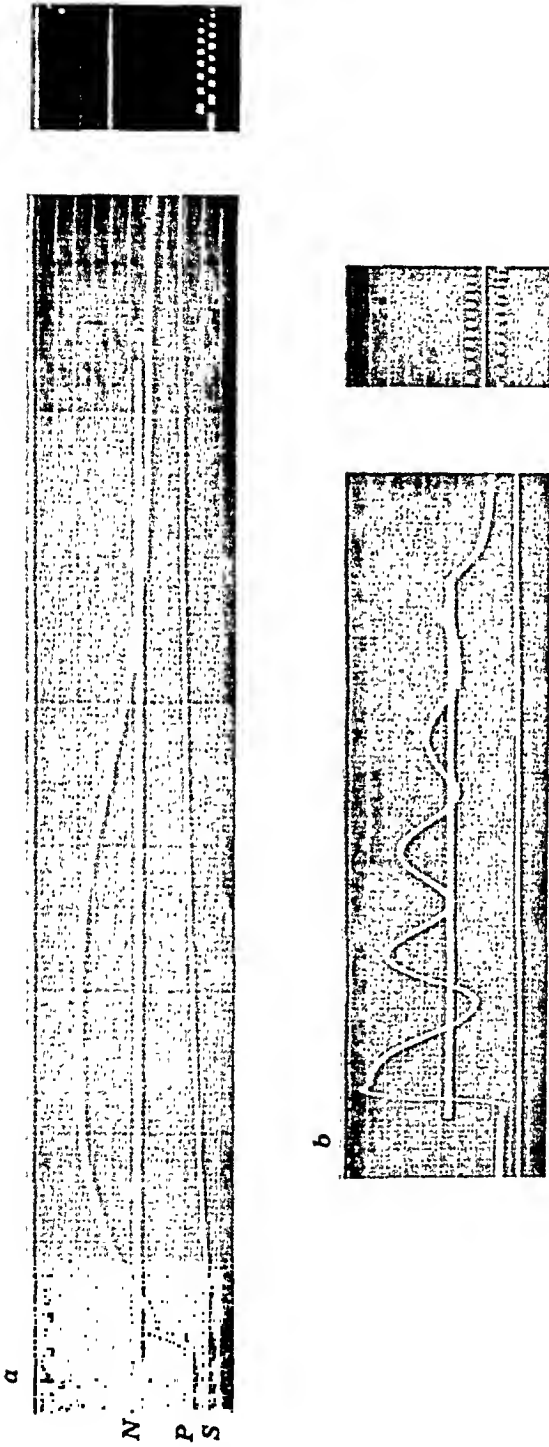


Fig. 19. Sympathetic electrogram of cat. *a*, Normal type. N = signal for sympathetic stimulation (29.4 sec.), P = potential curve, S = secretion curve. Calibration for *a* by 0.5 mV. *b*, Extreme rhythmic form. Calibration for *b* by 0.5 mV.

electronegative in relation to the indifferent electrode. After a latent period that varied from 0.3—0.6 sec., but which was about 0.4 sec. in most cases, the curve first rises comparatively rapidly, sometimes almost as rapidly as the initial peak of the chorda electrogram. After the curve has ascended to about 2—3 mV, there follows as a rule a small negative depression, the size of which varies slightly. Often it is only a rapid reduction in the rate of rise of the response curve. This small negative depression is succeeded by a slow ascent and the curve gradually reaches its maximum, remaining at nearly plateau-height for several seconds. This maximum varies from under 3 to over 6 mV: After it the curve begins to fall slowly *during stimulation*. This descent proceeds at about the same rate as the previous slow rise. The point, at which the fall begins, varies and, as a rule, follows between 8 and 15 sec. after beginning stimulation. Generally the curve drops during stimulation to a level near the baseline and afterwards descends slowly, without any off-effect, to the latter.

The electrogram in fig. 19 a thus represents the usual type of curve in sympathetic stimulation of cats. This curve follows a comparatively even and simple course. Fig. 19 b, on the other hand, illustrates a sympathetic electrogram that differs from the normal type. This electrogram fluctuates rhythmically, a phenomenon probably comparable to the one which is sometimes seen in the chorda electrogram (cf. fig. 18, p. 60). The curve in fig. 19 b is an extreme case, and the sympathetic electrograms that differed from the normal type in fig. 19 a were intermediary forms between these two curves. With sympathetic stimulation the gland thus displays a certain inclination to develop rhythmic waves. These rhythms have already been discussed in connection with the chorda electrograms (cf. p. 60).

The course of secretion in sympathetic stimulation of cats is subject to greater variations than in chorda stimulation. In this respect it mirrors the variability of the sympathetic electrogram. It has also been possible to prove for the sympathetic response that a positive deflection is always connected with a distinct flow of saliva in the same way as in chorda stimulation. In fig. 19 a it is seen that the maximum of the curve in the electrogram coincides roughly with a maximum in the rate of secretion. It decreases greatly, when the response during stimulation descends towards the baseline. This was regularly observed in several experiments. — The latency of the secretion in sympathetic stimulation varies within comparatively large limits.

## B. Dependence of the sympathetic electrogram on different experimental factors.

### 1. Duration of stimulation.

In whatever phase of the sympathetic electrogram the stimulation is discontinued, the curve descends towards the baseline after cessation of stimulation. If stimulation is discontinued prior to the time, when the curve would have begun to drop during stimulation, it descends with comparative rapidity, but, if stimulation ceases later, the curve descends slowly and may even remain at a level that is above the baseline, from which the start was made. Thus off-effects as a rule do not occur in sympathetic electrograms. In some experiments, however, they were observed. Fig. 20 a (p. 67) shows an electrogram, in which the sympathetic stimulation was discontinued, when the curve had just attained its maximum. The cessation of stimulation is succeeded by a definite off-effect. The occurrence of off-effects in the sympathetic electrogram indicates that the latter also contains a smallish negative component. In the typical sympathetic electrogram no other signs of this component than the small negative notch can be seen. This notch can in any case be held to indicate that the sympathetic electrogram is made up of at least two components.

### 2. Strength of stimulation.

The sympathetic electrograms were obtained with stimuli of the same strength as those employed in chorda stimulation. Contrary to what is the case in chorda stimulation, a sympathetic response to weak stimulation does not differ to any extent worth mentioning in its general shape from one elicited by strong stimuli. Only the amplitude of the deflection is increased with increasing strength.

In the same way as in chorda stimulation, there is an upper limit above which the sympathetic electrogram is not affected by further increased strength of stimulation. This limit is the empirical maximum. In investigating the influence of other factors on the sympathetic electrogram maximal stimuli were employed.

### 3. Mode and frequency of stimulation.

Both induction currents and condenser discharges yielded electrograms of exactly the same appearance.

Frequencies of stimulation between 10 and 40 induction shocks



or condenser discharges per second were used as a rule in the experiments. When stimulation was maximal, it was impossible within these limits to find any influence of variations in frequency on the sympathetic electrogram.

#### 4. *Repeated periods of stimulation.*

Repeated periods of sympathetic stimulation were studied in several experiments. They did not, indeed, yield as uniform results as those obtained by means of repeated chorda stimulation, but nevertheless yielded a valuable contribution to the analysis of the sympathetic electrogram of cats, for they showed that this electrogram must contain a negative component in addition to the dominating positive one.

Fig. 20 b (p. 67) shows first a sympathetic electrogram of a comparatively common type. The curve descends towards the baseline during stimulation. When stimulation is discontinued, a weak off-effect ensues, but whether it is a true off-effect is somewhat uncertain on account of the otherwise rather wavy contour of the response. A few seconds after interrupting the stimulation, it is reintroduced. The result of this renewed stimulation is a definite negative depression accompanied by a reduced positive wave, which again descends during stimulation. Renewed stimulation again results in a negative depression. This is smaller than the previous one, and no positive wave is obtained any longer. — Such curves were seen in a few experiments, if sympathetic stimulation was repeated.

In fig. 20 b the distinct parallelism between the rate of secretion and the positive component is again evident.

The appearance of a negative component is, however, not the rule in repeated sympathetic stimulation. It is usual for the electrogram only to decrease in amplitude each time a stimulation is renewed and to descend more rapidly during stimulation until finally no electrogram can be obtained any longer (see fig. 28, p. 84). It is a characteristic feature of the sympathetic electrogram that it ceases to appear comparatively soon after prolonged or repeated periods of stimulation. In this connection it is noticeable that secretion also ceases simultaneously with the positive component. These observations are fully in conformity with the long-known fact (HEIDENHAIN, 1868) that only a comparatively small quantity of saliva is obtained in each period of sympathetic stimulation, and that secretion ceases rapidly in spite of continued stimulation.

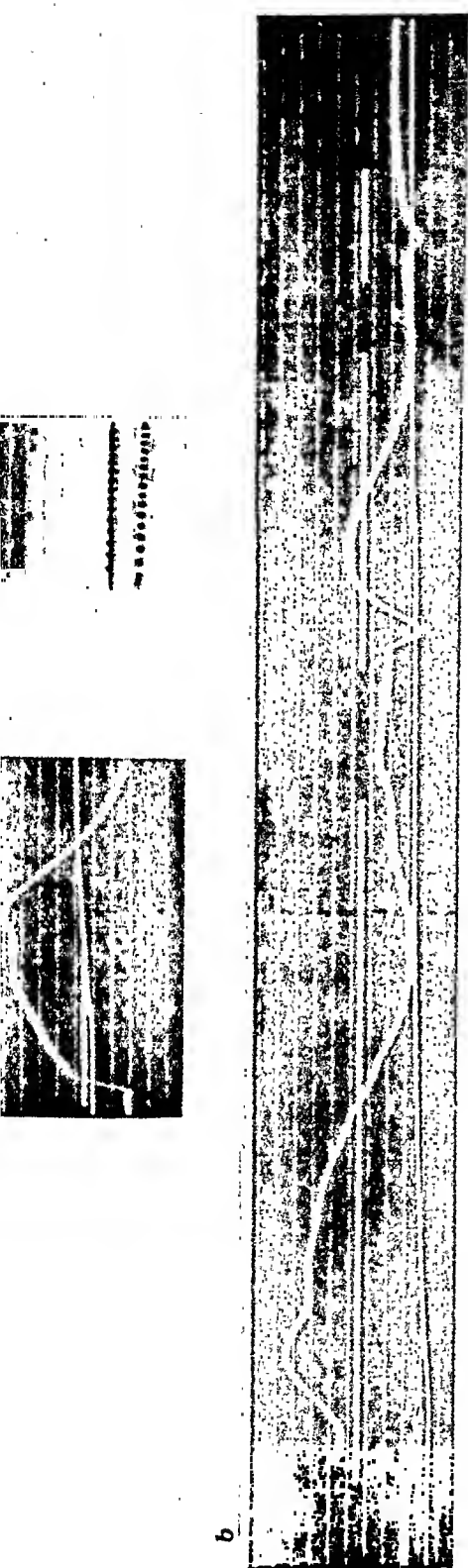


Fig. 20. Sympathetic electrograms of cat which indicate the occurrence of a negative component in these electrograms. *a*, Sympathetic electrogram with distinct off-effect. *b*, Repeated periods of sympathetic stimulation (first period 24.6 sec.). Distinct negative depression during the two later periods. Calibration for *a* and *b* by 1 mV.



Fig. 21. Influence of ergotamine on sympathetic electrograms of cat. *a*, Control curve (stimulation 6.6 sec.) before ergotamine. *b*, Sympathetic electrogram after intravenous injection of 0.5 mg ergotamine tartrate. *c*, Sympathetic electrogram after injection of 1 mg ergotamine tartrate. (All curves from same experiment.) Calibration by 1 mV.

### C. Sympathetic electrogram and the so-called „augmented secretion”.

The augmented secretion that is observed with sympathetic stimulation after previous chorda stimulation is a phenomenon much discussed in the literature. As chorda and sympathetic electrograms were very often examined in the same experiment and the scheme of work included simultaneous stimulation of both nerves, this phenomenon, if mirrored in the electrical response, might have proved a source of error.

In three experiments the sympathetic was stimulated before the chorda had been excited at all and also after the stimulation of the chorda. A definite «augmented secretion» was actually noticeable in each case and consisted in a prolongation of the sympathetic secretion. A parallel change was observed in the electrogram. The response curve fell during stimulation simultaneously with the cessation of the secretion. The amplitude of the deflection of the string, on the other hand, was much the same in both cases.

The augmented secretion therefore emphasizes the parallelism between the flow of secretion and the positive component of the electrograms. There is no evidence of any new component being added to the sympathetic electrogram in connection with this phenomenon. The facts only indicate that a preceding chorda stimulation slightly prolongs the duration of the positive component in this electrogram. When necessary, this factor has been taken into account in the analysis of alternating stimulation of the two nerves.

### D. Atropine and eserine.

Three experiments with atropine were carried out with sympathetic electrograms of cats.

BAYLISS and BRADFORD (1887) state that the positive component, which dominates the sympathetic electrograms of cats, is affected by small doses of atropine. This observation agrees with the results of the present work.

In these three experiments doses of 0.5—1.0 mg of atropine sulphate were injected intravenously. These doses completely abolished the chorda electrograms. The amplitude of the sympathetic electrogram was reduced by  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ , while the latency and further course of the response were much as before the atropine.

This effect of atropine on the sympathetic electrogram is also in accord with LANGLEY's (1901—02) statement concerning the secretion obtained by injecting adrenalin into cats: »It will cause a secretion from the sub-maxillary gland after atropin has been given in sufficient quantity to paralyse the chorda tympani . . . .». — »But after a large dose of atropin, injection of supra-renal extract into a vein does not cause secretion.»

The influence of larger doses of atropine was not investigated.

In five experiments the sympathetic electrogram of cats was recorded after the injection of eserine which was used in doses of 0.5—1.0 mg of eserine salicylate. While the effect on the chorda electrogram is very definite, the sympathetic electrogram is not affected at all by these doses. This observation is important for the results obtained below, when sympathetic excitation is superimposed on the off-effect following chorda stimulation of an eserinated animal.

### E. Ergotamine.

As the negative component of the chorda response could be isolated with atropine, it was interesting to study the effect on the sympathetic electrogram of the corresponding sympathetic »paralyser» ergotamine.

The effect of ergotoxine on the secretion of the submaxillary gland in nerve stimulation was investigated by DALE (1906) who found that it impedes sympathetic secretion, while the chorda secretion remains intact. This observation was verified by WOLFF, CATTELL and CLARK (1934).

No investigations appear to have been made on the effect of ergotamine or ergotoxine on the action potentials of the submaxillary gland. In the present work only two experiments were made with ergotamine (GYNERGEN), but the results should be worth mentioning.

In both experiments 0.5 mg of ergotamine-tartrate (GYNERGEN, SANDOZ) were first injected. In one of them a slight positive deflection was obtained by subsequent sympathetic stimulation, but not until the sensitivity of the string had been increased. — In the other experiment (see fig. 21, p. 67), however, after 0.5 mg of ergotamine tartrate an electrogram was obtained, in which the curve (fig. 21 b) after a small positive wave falls below the baseline and does not rise again until stimulation has been discontinued. This response, indeed, confirms the existence of a

negative component in the sympathetic electrogram. After the injection of another 0.5 mg of the drug, the same result was obtained as with the smaller dose in the former experiment. The whole negative component disappeared and only a small positive deflection remained (fig. 21 c) which equalled about 6 % of the control curve (fig. 21 a) before ergotamine. In fig. 21 c stimulation was repeated 3 times. The small deflection appears in each case. — After ergotamine no secretion could be observed in stimulating the sympathetic.

Thus, the negative component was not obtained in a pure form. This may be due to the circumstance that the difference of the two components in sensitivity to ergotamine in the sympathetic electrogram may not be sufficiently selective for an isolation of either of them by this poison.

Neither the chorda electrogram nor the corresponding secretion curve were affected by ergotamine. The results thus fully agree with the observations of DALE (1906) and WOLFF, CATTELL and CLARK (1934) concerning the influence of ergotoxine on the secretion from the gland.

## VI. Action potentials of the submaxillary gland of cats during simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic.

A much discussed problem that is important from the point of view of both nerve and gland physiology and still remains unsolved, is the question of the innervation of the secretory cells in the salivary glands. It is known that they are innervated by the *chorda tympani* and the sympathetic, both of which function as actual secretory nerves. What elements are innervated by the chorda and what elements by the sympathetic, or whether possibly all the elements are innervated by both nerves, are questions that still await a final solution.

As it must be assumed that the action potentials of the submaxillary gland are intimately connected with the function of the secretory cells, it is only natural that it should be possible by electrophysiological means to solve the problem of the innervation of the salivary glands. — By stimulating one of the nerves during excitation of the other a response curve should be obtained, from which it should be possible to conclude, whether both nerves innervate different elements or not. In the former case the normal electrogram from one nerve should be superimposed on that of the other, in the latter case there should be partial or complete occlusion of one by the other. On the basis of experiments of this general type CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 c) came to similar results. The latter concluded that the *chorda tympani* and the sympathetic innervate different elements in the gland, one possibly the mucous, the other the serous cells.

— In the present work 9 experiments were made with simultaneous stimulation of both nerves. The results were very uniform, and contrary to those obtained by earlier investigators, who apparently did not use maximal stimulation, without which the problem obviously cannot be solved.



Fig. 22. Sympathetic stimulation during chorda stimulation (first part of the curve) and chorda stimulation during sympathetic stimulation (later part). (Cat.)

### A. Sympathetic stimulation during chorda stimulation.

Sympathetic stimulation was introduced a few seconds after the initial changes of potential following chorda stimulation, *i.e.* when the chorda electrogram had adopted a fairly straight, slowly rising course. Sympathetic stimulation was discontinued in advance of cessation of chorda stimulation. The first part of the curve in fig. 22 shows the result of such an experiment. Sympathetic stimulation, marked by the horizontal band in the middle of the curve, produces no change whatever in the normal chorda electrogram! As a control, sympathetic stimulation was renewed (in fig. 22) immediately after the off-effect of the chorda electrogram had passed. This excitation now produces an ordinary sympathetic response. On this a short chorda stimulation was superimposed, which now produces the phenomenon to be described below in fig. 23 a.

Sympathetic stimulation superimposed on the response of maximal chorda stimulation, was recorded photographically more than 15 times and the result was always the same. Sympathetic stimulation produces no change whatever in the normal chorda electrogram. Nor can any change be seen in the course of secretion.

## B. Chorda stimulation during sympathetic stimulation.

Stimulation of the chorda was, as a rule, superimposed on the maximum of the sympathetic response. Fig. 23 a (p. 74) illustrates the result which is rather remarkable.

After a latency corresponding to the latency of the negative component of the chorda electrogram (0.4 sec.), the chorda stimulation superimposed on the sympathetic electrogram produces a strong negative deflection, after which the curve follows the slowly rising course characteristic of the isolated negative component of the chorda response. When the chorda stimulation is broken off, the curve ascends as the rising phase of an ordinary off-effect, but stops at the level of the normal sympathetic electrogram thence to continue as an ordinary sympathetic response. Fig. 23 b shows the control curve for the chorda electrogram, fig. 23 c the control curve for the sympathetic electrogram.

The phenomenon described is similar to what occurs, when chorda stimulation is renewed on its own off-effect (see above, fig. 11, p. 44, and fig. 13 c, p. 50), and also similar to the »reversal of the sign of the response» described by CANNON and CATTELL (1916). The fact that the off-effect is depressed by renewed chorda stimulation, has already been explained. It means that the positive component is still present as an off-effect, while the quickly disappearing negative component has ceased and is ready to set in afresh with the new stimulation.

*When chorda stimulation is introduced on the sympathetic electrogram, the negative component of the chorda electrogram is obtained, superimposed on it.* This must signify that the positive component of the chorda response is already present in the maximum of the sympathetic response, i.e. that the positive components of both electrograms are identical.

If chorda stimulation is introduced before the sympathetic electrogram has attained its maximum, a small positive component in the form of a small initial peak is obtained in response to the chorda stimulation. This phenomenon is seen in fig. 24 (p. 74). This curve also clearly illustrates the fact that only the rising phase of the off-effect appears, when the chorda stimulation is discontinued at the maximum of the sympathetic electrogram.

The consequence of the positive components of both electrograms being identical must be that both electrograms with respect to these components have their origin in the same processes in the same elements in the gland. — The phenomena described



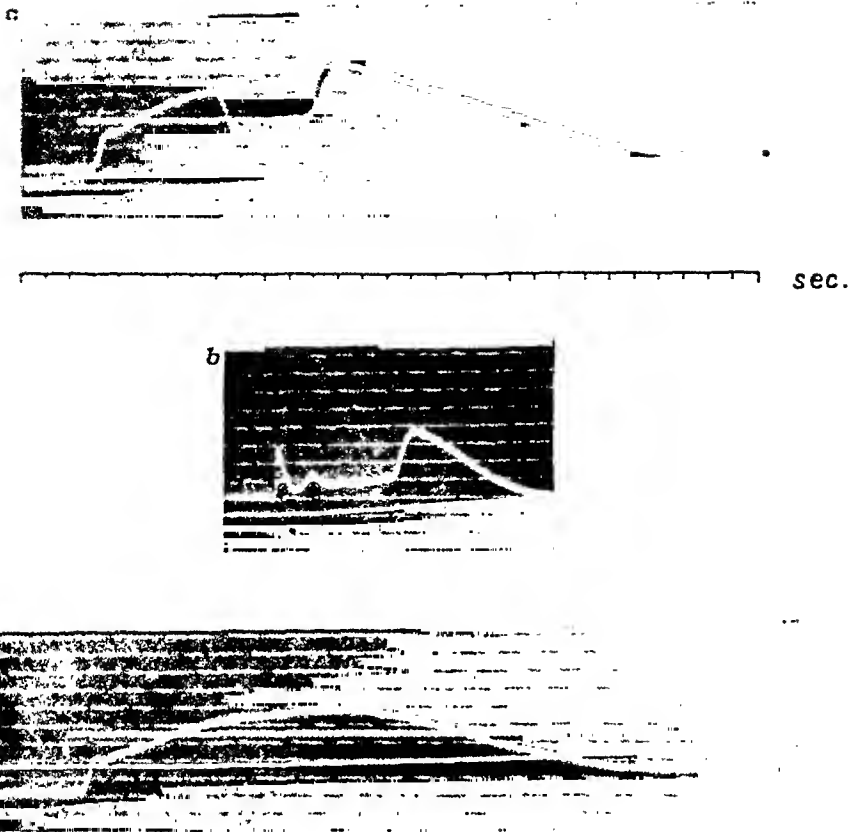
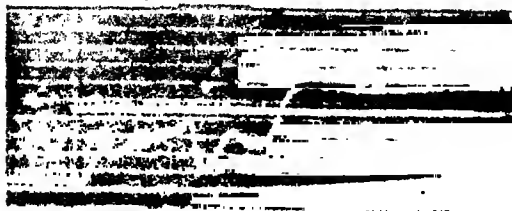


Fig. 23. Chorda stimulation during sympathetic stimulation. (Cat.) *a*, A period of chorda stimulation lasting 3.8 sec. was introduced immediately before the sympathetic electrogram would have attained its maximum. *b*, Control curve for the chorda electrogram. *c*, Control curve for the sympathetic electrogram.



Chorda stimulation during sympathetic stimulation. (Cat.) After the chorda stimulation the curve ascends to a level, at which it remains during continued sympathetic stimulation.

also verify the analysis of the components of the chorda electrogram in a very convincing manner. The curve in fig. 24 proves that the off-effect of the chorda electrogram is due to the negative component ending before the positive one. In this curve the positive component continues undiminished on account of the continued sympathetic stimulation after the negative component has ceased. The calculated latency of the negative component was also verified in these experiments.

The observation described above, that sympathetic stimulation introduced on a chorda electrogram does not alter the latter, agrees completely with the conclusion that the positive components of the chorda and sympathetic electrograms are identical.

### C. Sympathetic stimulation during „eserine off-effects”.

The question as to the small negative component of the sympathetic electrogram also seemed worth attacking with these methods. That such a component must exist, had already been shown by experiments described above.

As the negative component of the chorda electrogram could be obtained superimposed on a sympathetic electrogram, it seemed possible that the small negative component of the sympathetic electrogram could be isolated superimposed upon the long «eserine off-effect» after chorda stimulation, seeing that this off-effect represents the positive component of the chorda electrogram in a pure and maximal form. These off-effects also had a sufficiently horizontal

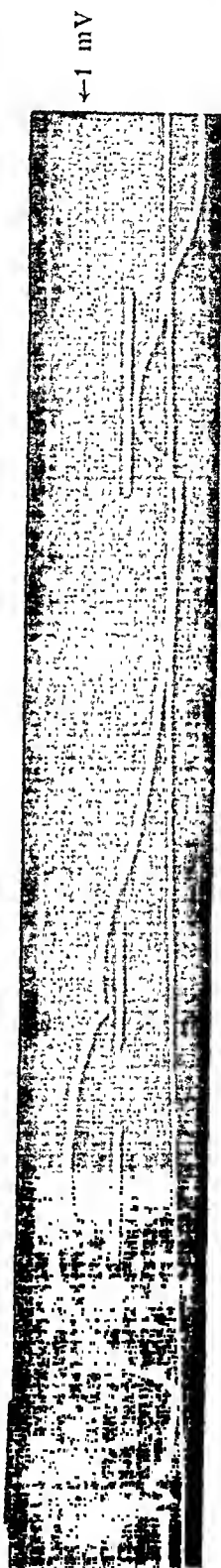


Fig. 25. Sympathetic stimulation (cat) during and after a so-called eserine off-effect. The curve starts with a chorda electrogram, on the long off-effect of which two short periods of sympathetic stimulation have been introduced. Note the negative depression. — After the off-effect has gone down, a sympathetic stimulation produces an ordinary sympathetic electrogram.

course to let the form of any negative component superimposed upon it appear with minimal distortion.

Fig. 25 (p. 75) shows a chorda electrogram after the injection of 0.5 mg of eserine salicylate. Two shorter sympathetic excitatory periods were introduced on the long and powerful off-effect. Both times a very definite negative deflection was obtained. On cessation of the sympathetic stimulation the curve rises again slightly. These negative deflections must be the negative component of the sympathetic electrogram in its pure form.

The eserine off-effect, which represents the positive component of the chorda electrogram, is identical with the positive component of the sympathetic electrogram according to the results described above. Therefore, as had been predicted, a sympathetic stimulation on this off-effect elicited the small negative component superimposed upon the large positive one.

In the curve of fig. 25 sympathetic stimulation was renewed as a control after the eserine off-effect had descended to the baseline. It now produces an electrogram of the ordinary type with both a positive and a negative component.

If sympathetic stimulation followed chorda stimulation of a heavily eserinated gland (cf. fig. 13 b), so that the duration of the negative component had also been prolonged and no off-effect was present, the curve, as expected, was not altered at all by sympathetic stimulation. The negative component is in this case present in almost full size long after chorda stimulation has ceased.

Considering that sympathetic stimulation during chorda stimulation does not in any way affect the normal chorda electrogram, while the negative component of the sympathetic electrogram is produced on the off-effect, it must be assumed that this negative component is identical with a part of the negative component of the chorda electrogram.

#### **D. Course of secretion during simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic.**

The experiments on simultaneous stimulation of the chorda and the sympathetic also contributed towards elucidating the relation between action potential and secretion. It is evident from experiments already described that the positive component is always combined with a definite flow of saliva, while the negative

component, when isolated, is not. But, when the negative component is activated on a fully developed positive component (fig. 23 a, p. 74), an increase in the rate of secretion is regularly seen (fig. 22 is a single exception). Probably therefore this component also has some connexion with the mechanism of secretion (cf. also fig. 13 c, p. 50).

## VII. Action potentials of the submaxillary gland due to intra-arterial injection of acetylcholine or adrenaline.

Recent researches have shown that the effect of the nerves on the salivary glands is probably transmitted chemically, the parasympathetic effect by means of acetylcholine (GIBBS and SZELÖCZEY, 1932 a and b; BABEIN, STAVEAEY and ALLEY, 1932; WOLFF, CATTELL and CLARK, 1934) the sympathetic effect by sympathin (WOLFF, CATTELL and CLARK, 1934), the latter being probably identical with adrenaline.

It has been known for a long time (LANGLEY, 1901—02) that adrenaline, injected into the blood vessels, causes secretion from the submaxillary gland, and ANOCHIN and ANOCHINA-IVANOVA (1929), A. V. BEZNÁK (1932), M. BEZNÁK and FARKAS (1937) and GIBBS and McCLANAHAN (1937) found that the gland secreted upon injection of acetylcholine. — The recording of action potentials from the submaxillary gland in response to intra-arterial injections of acetylcholine (Ach) or adrenaline (Adr) was of interest in itself and also because there were differences of opinion as to a possible cholinergic effect of sympathetic stimulation (SECKER, 1934 a and b, 1936; FELDBERG and GUIMARAIS, 1935 a and b).

In the experiments with Ach and Adr in the present work injections were made into the common carotid artery on the side of the prepared gland. The *chorda tympani* and the cervical sympathetic trunk were severed. The solutions were warmed up to body temperature. Just before the injections the common carotid artery was compressed somewhat above the point of injection. In one experiment all the branches of the artery except the a. submaxillaris were ligated. This experiment; however, yielded the same result as the others, in which no ligatures were made. — As all the experiments with Ach and Adr were made at a comparatively early stage of the present work, the baseline of the instrument was slightly more unstable than in later experiments, and the course of secretion was not recorded.

### A. Acetylcholine.

Intra-arterial injections of Ach were made in three experiments. Altogether 15 successful curves for action potentials were recorded in connection with the injections. These were made with Ach-chloride dissolved in 5 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 mg Ach/cm<sup>3</sup>), this solution

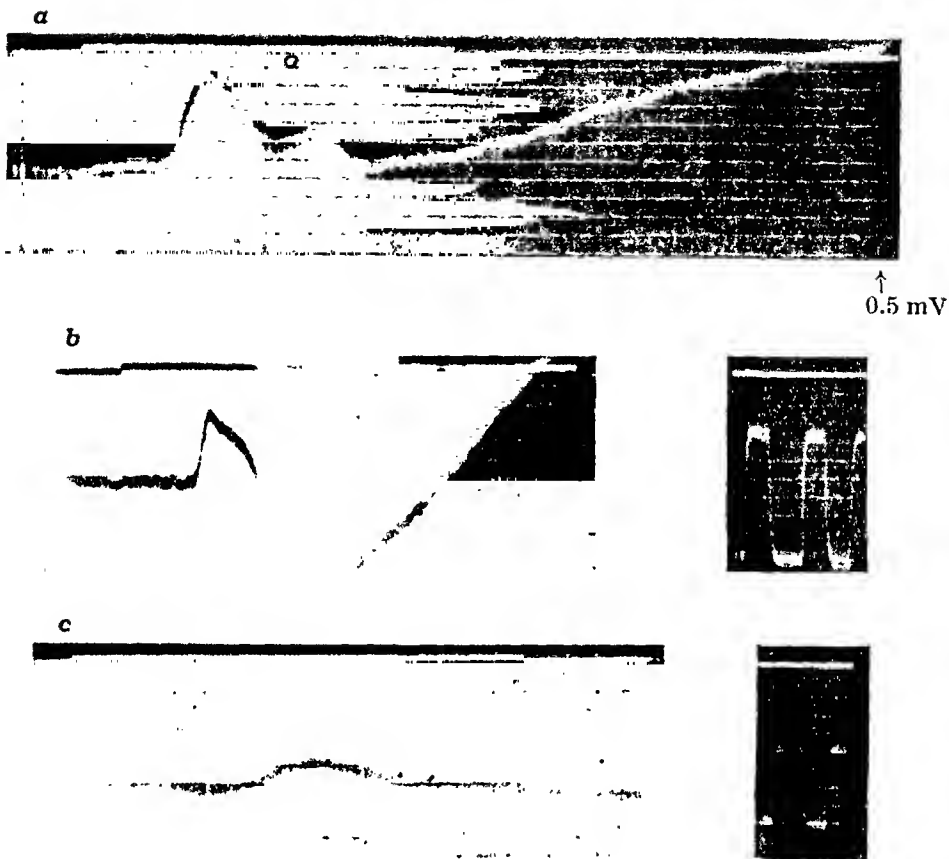


Fig. 26. Action potentials of the submaxillary gland of the cat on intra-arterial injection of acetylcholine. *a*, The signal on the upper edge of the film marks the time of an injection of about  $0.7 \gamma$  Ach into the common carotid artery. *b*, The signal marks an injection of about  $1 \gamma$  Ach. Calibration for *b* by  $0.5 \text{ mV}$ . *c*, Injection of indifferent control solution after a preceding Ach injection. Calibration for *c* by  $0.5 \text{ mV}$ .

being diluted just before the experiment with Ringer's solution to a concentration of  $2 \gamma \text{ Ach/cm}^3$ . As a control Ringer's solution was used with a content of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  corresponding to that of the injected Ach solution.

When a control solution was injected before Ach, no response was obtained from the gland. After Ach-injections, however, changes of potential were regularly observed also in connection with the injections of control solution.

Fig. 26 *a* shows a response obtained after injecting  $0.3 \text{ cm}^3$  of Ach-solution, containing about  $0.7 \gamma$  Ach, intra-arterially. The time of the injection is marked approximately by the signal above the curve. The response displays an unmistakable likeness to the normal chorda electrogram. A definite initial peak, a smaller

secondary positive wave and a subsequent slow ascent are seen. All the other Ach-electrograms also displayed great resemblance to the chorda electrogram. All were polyphasic during the first few seconds, an indication that Ach, like chorda stimulation, activates both a positive and a strong negative component. The occurrence of a strong negative component in the Ach curve is clearly evident in fig. 26 b which illustrates a response to an injection of about 0.5 cm<sup>3</sup> of Ach-solution (1  $\gamma$  Ach). In this curve the string makes a strong negative deflection after the initial positive peak. A larger or smaller negative deflection of this kind extending below the baseline occurred in 5 electrograms obtained with Ach-injection.

Fig. 26 c represents a typical deflection obtained on injecting control solution *after* an Ach injection. These deflections disappeared after the gland had been washed out several times.

### B. Adrenaline.

Fig. 27 a and b (p. 81) display two typical curves obtained by intra-arterial injection of Adr. In both cases 0.8 cm<sup>3</sup> of Adr-solution were injected, this volume containing about 0.05 mg of Adr. The response to adrenaline was studied in three experiments, but in these only 5 curves could be obtained in all. This was due to the fact that after an Adr-injection no deflections whatever, nor any secretion was obtained from the gland by a subsequent Ach or Adr injection. This was probably due to the solutions not reaching the gland owing to strong contraction in the vessels. The other three response curves had the same appearance as those of fig. 27. In spite of the few experiments, it should be possible from their complete uniformity to conclude that Adr in contrast to Ach, does not activate any strong negative component, because all the curves are almost monophasic and consist of an apparently pure positive deflection.

### C. Discussion of Ach and Adr.

The electrical response of the submaxillary gland on injection of Adr had been recorded both by CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 a). The former made the injections intravenously, the latter intra-arterially. These investigators obtained curves that corresponded entirely to the sympathetic electrograms. It should be noted in this connection that CANNON

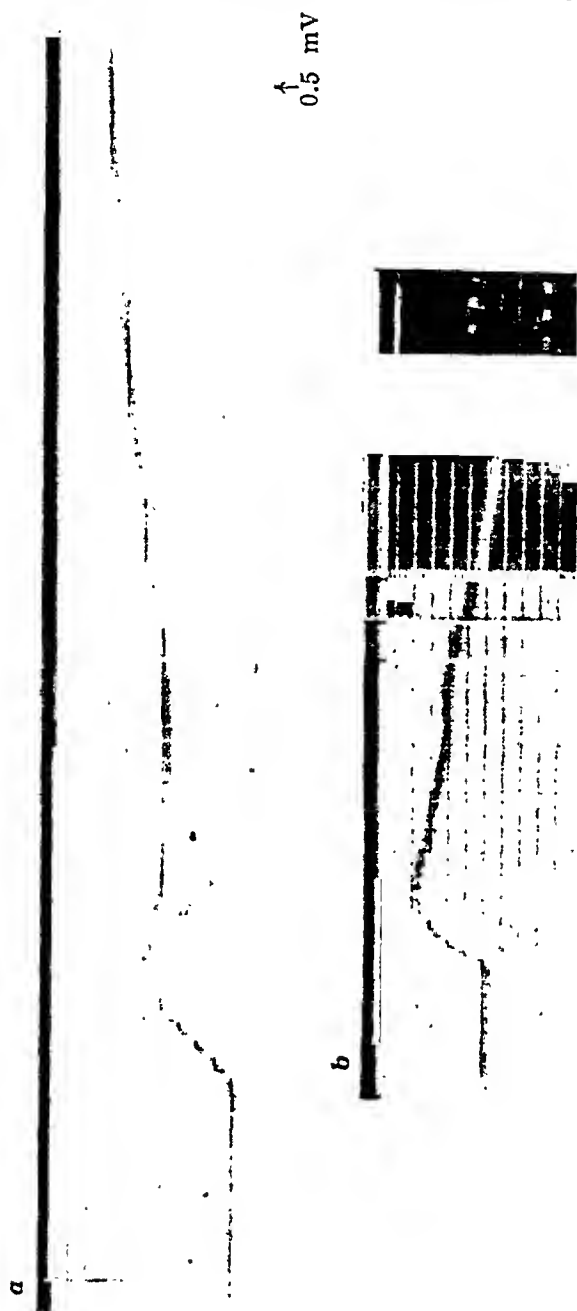


Fig. 27. Action potentials of the submaxillary gland of the cat on intra-arterial injection of adrenaline. *a* and *b*, The signal on the upper edge of the film marks an injection of 0.05 mg of Adr. Calibration for *b* by 0.5 mV.

and CATTELL worked with cats and obtained a positive deflection to both sympathetic stimulation and Adr, while v. HARREVELD on dogs obtained a negative deflection in both cases. It was confirmed in the experiments described above that both methods of stimulation in cats produce a mainly positive response.



The electrical response of the gland due to Ach-injection had not been recorded previously.

The difference between the electrical responses of the sub-maxillary gland of the cat due to Ach and Adr was thus proved to correspond to the difference between the chorda and the sympathetic electrograms. *The chorda and Ach activate a strong positive and a strong negative component, while the sympathetic and Adr chiefly activate a positive one.*

## VIII. Relations between chorda and sympathetic electrograms.

### A. The chorda and the sympathetic activate the same processes.

From the experiments illustrated in fig. 22—25 it is evident, as already stated, that the positive component in the sympathetic electrogram is identical with the positive component of the chorda electrogram. The negative component of the sympathetic electrogram is also identical with a fraction of the negative component in the chorda electrogram. It must follow from these facts that the chorda and sympathetic responses both have their origin in the same processes in identical elements in the gland, though to some extent the chorda effect predominates quantitatively. If, as must be assumed, the action potentials are connected with the secretory function of the glandular cells, it follows that the sympathetic jointly with the chorda innervates the same cells in the gland. This agrees, too, with the overlapping in innervation that is found in organs innervated by the vegetative nervous system.

That CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 c) obtained contrary results was probably due to the submaximal stimuli, in the work of the latter probably necessitated by the fact that he did not succeed in eliminating the artefacts of stimulation. It is therefore probable that, in stimulating the first nerve, not all glandular elements were activated, and that the remaining ones were thrown into activity during stimulation of the other nerve. It is also possible that v. HARREVELD stimulated the second nerve after all or some of the glandular elements had become refractory to the stimulation of the first (cf. fig. 28, p. 84), and we have seen above how complex curves can be given by such interference phenomena.

**B. Diminution of the electrograms with prolonged and repeated periods of stimulation is due to the influence of other processes on those responsible for the potentials.**

The positive component in the sympathetic electrogram can attain the same size as the positive component in the chorda electrogram, which implies a total overlapping on the part of the effect of

both nerves in regard to this component (cf. figg. 22—25, pp. 72—75.) The positive component of the sympathetic electrogram, however, rises more slowly than that of the chorda electrogram (cf. fig. 16, p. 57 and fig. 19 a, p. 63). This probably also holds good for the negative components. The positive component soon declines during sympathetic stimulation and is quickly diminished after repeated periods of stimulation (cf. fig. 28). The positive component in the chorda electrogram is considerably less sensitive to prolonged and repeated periods of stimulation (cf. fig. 5 b, p. 31 and fig. 9, p. 41). As the component potentials of the chorda and the sympathetic electrograms have been shown to be qualitatively identical, the differences in the rate of rise and in the sensibility to prolonged stimulation must be due to differences in processes that are not identical with those which are directly responsible for the potentials. It is also evident from fig. 28 that the diminution of the sympathetic electrogram is not due to an actual refractoriness of the potential mechanism. Subsequent chorda stimulation gives rise to a practically normal electrogram,

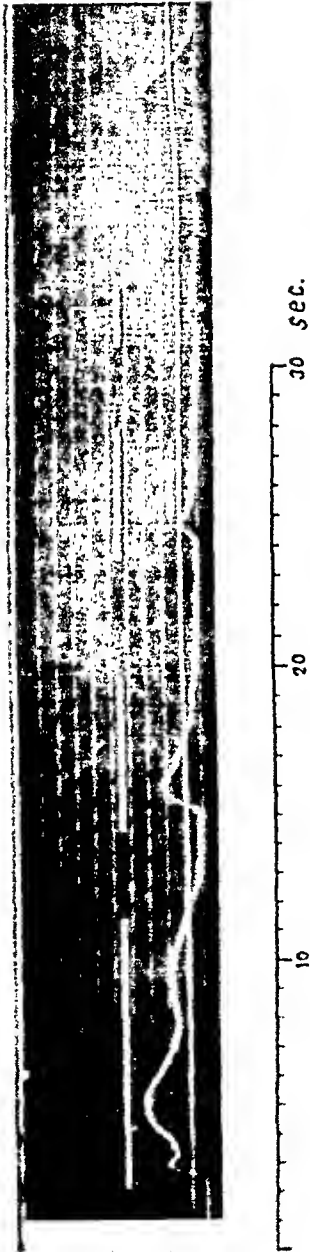


Fig. 28. After the sympathetic electrogram has been almost abolished by repeated periods of stimulation, an entirely normal chorda electrogram is obtained. (Cat. 1).

1) Flow of sympathetic saliva retarded by disturbing factors.

while at the same time the sympathetic electrogram is diminished to next to nothing. On the other hand, it is not impossible that the gradual reduction of the negative component in the course of a long experiment, may be due to an actual exhaustion, and then the diminution noticed may possibly be connected with the disappearance of organic secretory material from the cells (cf. p. 96).

— We know that the sympathetic electrogram can be elicited after the chorda electrogram has been extinguished by atropine, and that the latter electrogram is obtained after the former has been removed by ergotamine. The effect of atropine takes place at a locus which is peripheral relative to the locus of Ach-formation between the postganglionic neuron and the glandular cell (GIBBS and SZELÖCZEY, 1932 b). The processes behind the potentials therefore lie distal to the points, where Ach or Adr act on the glandular cell.

### **C. The difference between chorda and sympathetic electrograms with regard to the positive component.**

The phenomenon that has been called «augmented secretion» (sympathetic stimulation after chorda) has been shown in the present work to be connected with a prolongation of the duration of the positive component in the sympathetic electrogram. Mc INTOSH and RAWLINSON (1935) have shown that the «augmented secretion» is probably connected with increased sensitivity to sympathetic stimulation in the secretory cells.

The duration of the sympathetic secretion as well as of the accompanying positive component must therefore be determined by a process that lies so far in the periphery that it can be influenced by *both* the chorda and the sympathetic, *i.e.* beyond the place where Ach and Adr are produced.

We also know that injection of adrenaline could not cause the protracted, continuous secretion characterizing continuous injection of Ach or chorda stimulation (ANOCHIN and ANOCHINA-IVANOVA 1929; GIBBS and McCLANAHAN, 1937). As the positive component in all respects varies in parallel with secretion and as the elements responsible for the potentials must be the same in chorda and sympathetic stimulation, there is reason to assume that the positive component (as well as the secretion), which is identical in both cases and can attain the same size, has a different rate of rise and duration according to whether Ach or Adr is acting on the gland.

The same conclusion is reached in another way which may provide an explanation of the difference in the rate of ascent and disappearance of the positive component in different electrograms. We know (see p. 53) that the positive component in the chorda electrogram is greatly diminished by repeated periods of stimulation after compression of the carotids. Besides, the rate of rise of this component is then reduced (cf. figg. 14 and 15, pp. 54—55). *Compression of the carotids may have the same effect as the contraction of the vessels that is produced by sympathetic stimulation and adrenaline. This well explains why the positive component of the chorda electrogram, after compression of the carotids, acquires the properties that are characteristic of the positive component of the sympathetic electrogram.*

— The analogy between the behaviour of the positive component in sympathetic stimulation and in chorda stimulation with closed carotids is emphasized also by NORTHROP'S (1935) results on the metabolism in the gland under nerve stimulation. After exhaustive sympathetic stimulation the increase in the lactic acid of the gland is about 4 times larger than after similar chorda stimulation. Northrup assumes that this difference is due to the vasoconstriction in sympathetic stimulation retarding the processes of recovery in the gland. — It is natural that it should be possible to obtain a similar effect by blocking the carotids. — BARCROFT'S (1908) statements concerning the oxygen and carbon dioxide metabolism in the gland lead to similar conclusions. In stimulating the chorda BARCROFT found that the metabolism was increased threefold in comparison with the gland at rest. In stimulating the sympathetic of cats he found that the consumption of oxygen was roughly the same as in the resting condition, while the production of carbon dioxide was reduced. Chorda stimulation is connected with increased metabolism, sympathetic stimulation is not. — It is obvious that the increased metabolism which usually accompanies chorda stimulation cannot take place in an asphyxiated gland.

We therefore conclude: *The chorda (Ach) and the sympathetic (Adr) act synergistically on the process responsible for the positive component of the electrical response, but the course of this component becomes different in the two cases on account of differences in the blood supply to the gland. This component is dependent on a sufficient supply of blood.*

As the rate of secretion varies in parallel with the positive component *this conclusion must also apply to the process of secretion.*

This is all the more significant, as practically the same conclusion was reached as regards the secretion by CARLSON, GREER and BECHT (1907—08), although it did not gain general recognition as an explanation of why sympathetic stimulation only produced secretion of short duration.

CARLSON et. al. mostly worked on dogs which slightly complicates the comparison of the results, but their conclusion regarding the influence of the circulation on the secretion is nevertheless applicable to the positive component of the electrograms. This is emphasized by the following facts: Sympathetic stimulation produces more secretion in cats than in dogs. The vasoconstriction due to sympathetic stimulation is greater in dogs than in cats (CARLSON, GREER and BECHT, 1907—08; CARLSON, 1907). The positive component in the sympathetic electrogram of cats is easily reduced by excitation; the corresponding component in the sympathetic electrogram of dogs is scarcely discernible (see p. 90). — Since these facts indicate that the difference between the positive component in the sympathetic electrograms of cats and dogs is only quantitative, the electrophysiological results also verify the following statement by CARLSON, GREER and BECHT: »With the arterial blood supply to the gland almost shut off in the dog, stimulation of the chorda produces only a few drops of saliva, and after periods of rest subsequent stimulation of the nerve yields gradually less saliva. We have here, apparently, a duplication of the usual rapid failure of the secretory nervous mechanism typical for the sympathetic secretory fibres in the dog.» — The conclusions of these workers concerning the variations in the composition of the saliva agree very well with the electrophysiological results. I shall return below to this question.

#### **D. The difference between chorda and sympathetic electrograms in regard to the negative component.**

Intra-arterially injected Ach activates both a strong positive and a strong negative component, while injection of Adr seems to activate only the positive component. The negative component in the chorda electrogram is large, the negative component in the sympathetic electrogram is very small. This difference between the chorda and sympathetic electrograms can therefore be explained by the different effect of Ach and Adr on the gland. From this it follows that the difference between chorda and sympathetic responses can be considered to be due mainly to some processes in

the gland reacting differently to Ach and Adr or only to one of them.

Whereas the positive components in the respective electrograms are produced by the same processes in the same elements and the differences between them are due to external factors such as the blood supply, the cause of the difference between the negative components in the two cases is less clear. The negative component in the sympathetic electrogram is considerably smaller than the corresponding component in the chorda electrogram. The chorda innervation is therefore in this respect somehow more effective or more complete than the sympathetic innervation.

The chorda innervation may be more complete in such a manner that it reaches some cells which are not innervated by the sympathetic, or else the chorda may stimulate the individual cell more effectively. We cannot at present differentiate between these alternatives. We only know that all cells in the gland that give an electrical response to sympathetic stimulation (Adr), also react to chorda stimulation (Ach).

## IX. Action potentials of the submaxillary gland in dogs.

As most of those who had previously investigated the electrical response of the submaxillary gland, performed their experiments on dogs, it was held important to study the electrograms in that animal. BAYLISS and BRADFORD (1887) and v. HARREVELD (1930 a) had stated that the sympathetic electrograms of dogs were mainly negative. That this is not the case in cats has been shown clearly in the present work. This difference between dogs and cats BAYLISS and BRADFORD connected with the findings (ECKHARD, 1860; HEIDENHAIN, 1868) that the sympathetic saliva of dogs was more viscid and contained more organic material than the chorda saliva, while the sympathetic saliva of cats was more watery and contained less organic material than the chorda saliva (LANGLEY, 1878, 1885). These facts, that the sympathetic saliva and the sympathetic electrograms are different in the two species, while the chorda saliva and electrograms are alike, point to a connection between the components of the electrogram on the one hand and the composition of the saliva on the other. The statements of CARLSON, GREER and BECHT (1907—08) and of CARLSON (1907) that vasoconstriction in sympathetic stimulation of dogs is stronger and that this probably affects the composition of saliva also suggested that it would be worth while recording electrograms of dogs.

### A. The chorda electrogram of dogs.

The chorda electrogram of dogs was recorded in 4 experiments. It has already been mentioned that the chorda electrogram of dogs corresponds to that of cats. The only difference was that the chorda response almost invariably displayed a small negative preliminary wave, looking like the a-wave in the electroretinogram. This is very seldom seen in the chorda electrogram of cats.

Fig. 29 b (p. 90) shows a chorda electrogram of a dog. The negative preliminary wave is smaller in this curve than usual. Fig. 29 a illustrates a normal electrogram of a cat. The difference between these two curves is insignificant. The normal chorda electrogram of dogs therefore lies within the limits of the variations of the normal electrogram of cats.



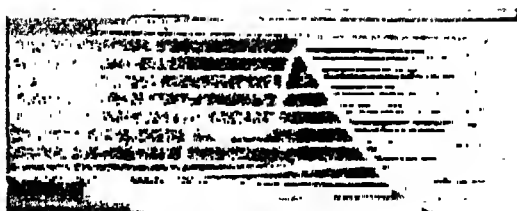
## B. The sympathetic electrogram of dogs.

The sympathetic electrogram of dogs was recorded in 3 experiments. All of them verified the statement of BAYLISS and BRADFORD (1887) and v. HARREVELD (1930 a) that this electrogram is of opposite sign relative to the chorda electrogram, *i.e.* that the outer surface of the gland in sympathetic stimulation becomes less electronegative in relation to the indifferent electrode. Fig. 29 d represents a typical electrogram of this kind. It will be seen

a



b



c



d

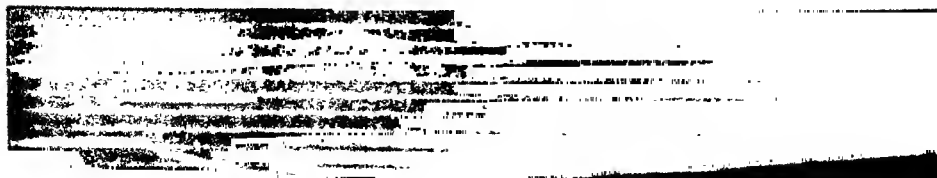


FIG. 29. *a*, Normal chorda electrogram of cat (stimulation 3.3 sec.). *b*, Normal chorda electrogram of dog (stimulation 4.2 sec.). *c*, Normal sympathetic electrogram of cat (stimulation 18.4 sec.). *d*, Normal sympathetic electrogram of dog (stimulation 4.4 sec.).

that it consists of a comparatively small negative deflection, the maximum amplitude of which is about 0.5 mV. The latency, which varied very much, was in this case almost 1 sec. In this curve the maximum is not reached until stimulation is over, and the curve ascends very slowly again to the baseline. This slow course of the process was regularly seen. In a few curves a small initial positive wave could be seen, indicating that the electrogram also can contain a positive component.

The sympathetic electrogram of dogs was accompanied as a rule by a scanty secretion of saliva. The secretion recorded in fig. 29 d may be described as unusually good.

Fig. 29 c shows, for the sake of comparison, a normal sympathetic electrogram of a cat. It is therefore evident from fig. 29 that *the chorda electrograms of dogs and cats are identical, whereas the sympathetic electrograms are of opposite sign.* BAYLISS and BRADFORD'S (1887) interesting observation must thus be regarded as confirmed.

## X. Some central problems in the physiology of the salivary glands in the light of electrophysiological results.

### A. Views of other authors on the parasympathetic and sympathetic innervation of the submaxillary gland.

The question as to whether the *chorda tympani* and the *n. sympatheticus* innervate the same or different cells in the gland was already the subject of discussion during the latter half of last century. HEIDENHAIN (1868) maintained on the basis of thorough investigations, that the chorda and the sympathetic innervated the same cells, an opinion which he based, among other things, on the fact that sympathetic stimulation after protracted chorda stimulation produced a saliva containing less mucine than before chorda stimulation. HEIDENHAIN thought that a protracted chorda stimulation impoverishes the cells of mucine, so that the latter is not available for a subsequent sympathetic stimulation.

LANGLEY (1889, 1890), whose whole conception of the innervating mechanism of the salivary glands differed from HEIDENHAIN'S (1868), held that the chorda and the sympathetic innervated different cells in the gland. LANGLEY based his view, among other things, on the fact that during histological investigation he had found that some cells always remained in a state of rest in spite of preceding strong chorda stimulation. This view that the two nerves innervate morphologically different elements, was shared by GASKELL (1920).

Subsequently other investigators also discussed this problem. Among the investigators who recorded the electrical response of the gland, CANNON and CATTELL (1916) and v. HARREVELD (1930 c) expressed views on this subject. They considered that both nerves activate different elements in the gland.

BABEIS remarked in 1928 that the whole question concerning the innervation of the glandular elements called for many entirely new investigations. — The innervation problem was discussed by HOLZLÖNNER and ARAPETIANZ in 1932. They held that GOLDENBERG'S (1924) observation, that both chorda and sympathetic secretion were affected by previous stimulation of the other nerve, indicated that both the nerves innervate

the same cells. GOLDENBERG's observation was further verified by HOLZ-LÖHNER and AIRAPETIANZ. They also held that sympathetic stimulation elicited only a part of the effect obtained by chorda stimulation, an opinion that agrees very well with the observation made in the present work, that the sympathetic electrogram corresponds to a fraction of the chorda electrogram.

BABKIN inclined in 1928 to the opinion that the same cells could give off saliva of different quality. Later, however, BABKIN (1934) also stated opinions on the question of the composition of the saliva and of gland innervation. He wrote as follows: »The secretory activity of such glands is not regulated *en masse*, but various nerves (for example, those innervating the submaxillary gland) or chemical agents stimulate or inhibit each set of secretory elements separately.» — »... it may be concluded that the *qualitative* changes which occur in many digestive secretions under various conditions of stimulation are due to the unequal *quantitative* activity of different groups of secretory cells in a given gland.»

Several investigators have expressed views on the innervation of the glandular cells on the basis of histological results. MOLOY and SMITH (1930) found changes after chorda stimulation in the mitochondria in the submaxillary gland of rabbits in both the »trophochrome» and »homeochrome» cells, but none after sympathetic stimulation, from which they concluded that both kinds of cells in the gland were innervated by the *chorda tympani*. STORMONT (1932) arrived at the result that the »trophochrome» cells of the submaxillary gland of rabbits were innervated by the sympathetic, while the »homeochrome» cells and the duct cells were innervated by the *chorda tympani*. This view was based on the histological picture after degeneration of the sympathetic paths and on experiments with nerve stimulation.

RAWLINSON (1933) found that chorda stimulation of medium strength caused changes only in the »alveolar» cells in the submaxillary gland of cats. In the case of strong chorda stimulation indefinite changes in the »demilune cells» were also obtained, which, in contrast to the »alveolar cells», were greatly altered after sympathetic stimulation. In the »demilune cells» changes occurred after the injection of adrenaline in the same way as after sympathetic stimulation. RAWLINSON concluded that in the submaxillary gland of cats the »alveolar cells» were innervated by the chorda, the »demilune cells» by the sympathetic. This conclusion was supported by investigations of glands in a »paralytic state» (RAWLINSON, 1935 b). In the cells in the striated ducts RAWLINSON (1935 a) obtained changes both when the chorda and the sympathetic were stimulated.

McINTOSH and RAWLINSON (1934, 1935) found that the so-called »augmented secretion» remained, although the chorda secretion had been removed by atropine. After atropine chorda stimulation thus still produces an increase of subsequent sympathetic secretion. The histological material of this work (1935) was worked up by RAWLINSON (1936) who found that under the influence of atropine the chorda produces changes in the »demi-

lune cells which were held to be innervated by the sympathetic (RAWLINSON, 1933, 1935 b). On the basis of these physiological and histological results it was assumed (McINTOSH and RAWLINSON, 1935) that by diffusion of acetylcholine from the cells innervated by the chorda an effect was obtained on the cells innervated by the sympathetic. RAWLINSON did not, however, assume an actual double innervation of the «demilune cells».

JÄRVI (1939) found that injection of pilocarpine produced complete disappearance of the granules from both mucous and serous cells in the sublingual gland of cats. From this he concluded that the chorda innervates both kinds of cells in this gland.

FLEMING and McINTOSH (1934, 1935) established that degeneration of the chorda caused a much stronger and more protracted secretion to sympathetic stimulation and adrenaline than under normal conditions. The most probable explanation of this was held to be that the paralytic gland continuously received impulses from the postganglionic fibres of the chorda. It was therefore supposed that the increase referred to in the sympathetic and adrenaline secretion was analogous to the so-called «augmented secretion». Both these phenomena were thought to be interesting examples of synergism between the sympathetic and parasympathetic supply. The absence of antagonism between the two secretory nerves of the submaxillary gland, and the synergism between the adrenaline and acetylcholine in this case is also pointed out by CHAUCHARD, CHAUCHARD and CHAUCHARD (1937) as characteristic of the neurosecretory system of this gland.

## **B. The double innervation of the submaxillary gland in the light of electrophysiological results.**

It is evident from what has been said that the question concerning the sympathetic and parasympathetic innervation of the secretory cells in the submaxillary gland cannot by any means be considered to have been solved.

The electrophysiological results obtained in the present work by means of simultaneous stimulation of both the chorda and the sympathetic have undoubtedly shown that the processes behind the potentials in the submaxillary gland are localised to identical elements in both chorda and sympathetic stimulation. If the different processes (positive and negative component) are localised to the same or to different elements is not known. As the results of several earlier authors have shown convincingly that the secretory cells themselves give rise to the changes of potential (BAYLISS and BRADFORD, 1887; BRADFORD, 1887, 1888; CANNON and CATTELL, 1916; v. HARREVELD, 1930 c), it must be concluded that in the submaxillary gland of cats *all secretory cells that are*

innervated by the sympathetic, are also innervated by the chorda tympani, but that the chorda innervation in one way or another is more complete than the sympathetic innervation.

Seeing that the results in the present work support the general opinion that the chorda acts over acetylcholine and the sympathetic over adrenaline, it must be assumed that all secretory cells in the submaxillary gland of cats that are affected by adrenaline, are also affected by acetylcholine, and that the acetylcholine effect on the gland is more complete than the effect of adrenaline.

If BABKIN'S (1934) opinion (cf. p. 93) is applied to this case and the results of RAWLINSON (1933, 1936) are taken into consideration, the difference between chorda and sympathetic innervation of the gland would be due to acetylcholine affecting both serous and mucous cells, while adrenaline principally would affect the serous cells. This theory would be in agreement with the relations between the electrical response and the composition of saliva (cf. p. 100).

### C. Relations between the components of the action potential and the composition of the saliva.

In his monograph BABKIN (1928) establishes that the divergence between two glandular functions, the secretion of water and salts on the one hand and the secretion of organic matter on the other, is like a red thread passing through the whole literature concerning the function of the salivary glands.

In 1851 BECHER and LUDVIG showed that the content of organic substances in the chorda saliva decreases in parallel with increasing duration of stimulation. The same observation was made by HEIDENHAIN (1868, 1878), who mentions that the longer and more strongly the gland has secreted, the lower is the content of organic substances in the saliva, *i.e.* that the content of organic substances decreases in parallel with the increase in the secreted quantity of saliva. This conclusion was verified by LANGLEY and FLETCHER (1890), ANREP (1923) and ANREP and KAHN (1923—24). In recent years the same fact has been established by KEZTYÜS and MARTIN (1937). STAVRAKY (1940) stated that the concentration of protein-nitrogen in the submaxillary saliva shows a gradual diminution during prolonged stimulation of the *chorda tympani*.

There is, we may say, unanimous agreement about the fact that the content of organic substances, *i.e.* of colloids, in the saliva gradually decreases with prolonged or repeated chorda stimulation.

It has already been pointed out (see p. 32 and fig. 5), how the negative component is gradually reduced with prolonged chorda stimulation. According to HEIDENHAIN (1868) protracted stimulation leads to loss of organic material of the cells for the formation of saliva. ANREP and KAHN (1923—24) showed that restitution from this condition requires three days. In the present work it has also been shown that in a protracted experiment the negative component experienced a reduction that was irreversible during the time that the experiment lasted.

HEIDENHAIN (1868, 1878) also observed that the content of organic substances in the chorda saliva, principally mucine, increased in parallel with strength of stimulation. This observation was also verified by WERTHER (1886) and LANGLEY and FLETCHER (1890). In recent years LANGSTROTH, McRAE and STAVRAKY (1938 a) noted that the protein content of the chorda saliva increases under similar conditions.

It has been clearly shown in the present work that the relation of the negative component to the positive in the chorda electrogram, increases with increasingly stronger stimuli (figg. 6 A and B and fig. 7). Again the components behave in this respect like the content of colloids in the saliva.

LANGLEY and FLETCHER (1890) investigated the composition of the chorda saliva after compression of the carotids and in dyspnoe. Under these conditions a definite reduction of the secretion of water and salts was found, while the content of organic substances in the saliva increased. This observation was subsequently verified by CARLSON, GREER and BECHT (1907—08), who stated: »... compression of the gland arteries diminishes the quantity of chorda saliva and increases its percentage of organic solids.» ANOCHIN and LISAGOR (1930) arrived at a similar conclusion stimulating the gland reflexly.

The best proofs of the parallelism between components of the electrograms and the composition of saliva are provided by the experiments of CARLSON, GREER and BECHT (1907—08) and CARLSON and McLEAN (1907—08) as compared with the experiments described in the present work. The former investigators wrote: «There is probably no actual increase in the rate and quantity of secretion of the organic salivary constituents in gland anemia. This concentration is the result of diminution in the rate of secretion and the quantity of water and salts. The processes of secretion of water and inorganic salts are therefore more directly dependent on free oxygen than is the secretion of the organic matter in the saliva.»

It is evident from my own experiments that the positive component of the gland electrogram is more directly dependent on a sufficient blood supply than is the negative component (cf. figg. 14 and 15, pp. 54 and 55).

Most interesting is the observation of CARLSON and MCLEAN (1907—08) that during any single period of stimulation the percentage of organic solids in the saliva gradually diminishes, just as does the negative component in my electrograms. The percentage of organic solids varies with the length of the interval of rest between any two periods of stimulation, just as does the size of the negative component.

The difference between the sympathetic salivae of dogs and cats is explained by CARLSON, GREER and BECHT (1907—08) in such a way, that the greater anaemia with sympathetic stimulation in the gland of dogs influences the process that is connected with secretion of water and salts, more rapidly than is the case in the gland of cats. The difference between the sympathetic electrograms of dogs and cats fully harmonizes with the view of these investigators.

— The parallelism between the electrogram and the composition of saliva is in full agreement with the results of recording the secretion in the present work. It was established that the positive component runs parallel to the visible flow of saliva, which agrees with the view that it is connected with the secretion of water and salts, for the rate of secretion must be considered to be mainly dependent on the secretion of water.

With regard to the negative component, the latter did not always coincide with a visible flow of secretion, but in those cases, in which it was possible to activate it on a fully developed positive component, it was possible to demonstrate a definite increase in the rate of secretion.

By means of this comparison between the components of the electrograms and the literature on secretion of saliva, many arguments have been obtained in support of the conclusion of BAYLISS and BRADFORD (1887) that the secretion of organic substance runs parallel to a deflection of the galvanometer in one direction, whilst secretion of water and salts is combined with a deflection in the opposite direction.

The main arguments in favour of the positive component of the electrical response being connected with the secretion of water and salts and of the negative being connected with the secretion of organic matter, may therefore be summarized as follows:



1. a) The sympathetic electrogram of cats consists mainly of a positive deflection of the galvanometer (fig. 29 c, p. 90). The sympathetic saliva of cats contains less organic matter than the (first samples of) chorda saliva (LANGLEY, 1878, 1885; CARLSON, GREER and BECHT, 1907—08; LANGSTROTH, McRAE and STAVRAKY, 1938 b).
- 
- b) The sympathetic electrogram of dogs consists mainly of a negative deflection (fig. 29 d, p. 90). The sympathetic salivae of dogs contains much more organic matter than the chorda saliva (HEIDENHAIN, 1868; LANGLEY, 1878 and others).
- 
- c) The chorda electrograms of dogs and cats are alike and both contain a large positive and a large negative component (fig. 29 a and b, p. 90). The chorda saliva of dogs and cats both occupy an intermediary position between the two sympathetic salivae in regard to organic matter (LANGLEY, 1878; CARLSON, GREER and BECHT, 1907—08).
- 
2. a) The negative component of the chorda electrogram diminishes relatively quickly during any single period of stimulation. This diminution is dependent on the intervals of rest and is reversible in about a minute (fig. 5 a and b, p. 31, fig. 9, p. 41). The content of organic matter in the chorda saliva is greatly reduced during any single period of stimulation and varies under different periods dependent upon the intervals of rest (CARLSON and McLEAN, 1907—08).
- 
- b) During the course of prolonged experimentation the negative component of the chorda electrogram After prolonged or often repeated stimulation of the chorda the amount of organic material in the saliva gradually diminishes.

diminishes and this effect is irreversible for the duration of a single experiment (cf. fig. 5 a and b with c-c, p. 31).

This diminution is not reversible within 12 hours (cf. HEIDENHAIN, 1868; ANREP and KAHN, 1923—24; STAVRAKY, 1940).

---

3. The negative component of the chorda electrogram increases relatively more than the positive component with increased strength of stimulation (fig. 6 A, 6 B and fig. 7, pp. 35—37).

The percentage of organic matter in the chorda saliva increases with increased strength of stimulation (HEIDENHAIN, 1868, 1878; WERTHER, 1886; LANGLEY and FLETCHER, 1890; LANGSTROTH, McRAE and STAVRAKY, 1938 a).

---

4. After compression of the carotids the positive component in the chorda electrogram decreases during prolonged or repeated periods of stimulation more than the negative one, which shows greater resistance to this mode of interference (figg. 14 and 15, pp. 54—55).

After compression of the carotids the secretion of water and salts decreases in periods of chorda stimulation more than the secretion of organic matter, which percentually greatly increases (cf. LANGLEY and FLETCHER, 1890; CARLSON, GREER and BECHT, 1907—08; ANOCHIN and LISAGOR, 1930).

---

5. a) The size of the positive component in both the chorda and sympathetic electrograms varies in parallel with the rate of secretion.

Water constitutes the principal matter in the saliva, and the secretion of water altogether dominates the rate of secretion.

---

b) The rate of secretion increases, when the negative component is introduced by various means upon the positive.

This formidable list of arguments accumulated since the days of BAYLISS and BRADFORD (1887) verifies the far-sighted conclusion of these eminent workers (cf. p. 22). My electrophysiological results support them wherever it has been possible to check up on facts subsequently refuted by others.

As the organic matter in the saliva chiefly consists of colloids, it will be found that the arguments adduced above imply that *the so-called negative component of the action potentials of the submaxillary gland runs parallel to a secretion of colloids, while the positive component runs parallel to the secretion of water and salts.*

This is a result of a comparison between my experimental facts and those of other investigators. — It has already been mentioned that earlier workers developed theories concerning the manner of origin of the different components of the electrograms in the secretory cells. The question of the mechanism of origin of the action potentials has been left open in the present work. Nevertheless, it would seem that the parallelism between action potentials and composition of the saliva might provide a point of attack for further research into the relation of glandular action potentials to the secretory mechanism. Whether this relation has anything to do with depolarisation of different membranes in the glandular cell, which v. HARREVELD (1930 c) held to be the cause of the different component potentials, or with electrokinetic phenomena, to which, among others, KELLER (1930, 1932) and FÜRRI (1933) ascribed great importance, or with other electrochemical processes, is undoubtedly a question of general physiological importance which still awaits solution.

## XI. Summary.

For the experiments 46 decerebrated cats and 4 dogs were used. From them were obtained some 2500 records of electrograms. The submaxillary gland, the lingual nerve (*chorda tympani*) and the cervical sympathetic trunk were isolated, the nerves were severed and stimulated by induction shocks or condenser discharges.

The changes of potential in the gland were recorded by means of a string galvanometer and a directly coupled, balanced amplifier (fig. 2, p. 25). Leads were taken from the outer surface of the gland and a subcutaneous fascia in the decerebrating wound. In 16 experiments the flow of saliva from the gland was recorded continuously (fig. 3, p. 25).

The electrical response of the gland during chorda stimulation is called the «chorda electrogram», the response elicited by sympathetic stimulation the «sympathetic electrogram».

All statements to be made below refer to the submaxillary gland of cats, if not otherwise stated.

In contrast to the results of most of the earlier investigators (fig. 1, p. 16—17), it was found possible to obtain a constant and reproducible normal type of chorda electrogram in all experiments. In most of the experiments with sympathetic stimulation a constant type of sympathetic electrogram was obtained. In some experiments this electrogram differed from the normal type by having a wavy contour (probably owing to circulatory changes).

The fact that constant normal types of electrograms were obtained, was due to amplification (which made resistance changes inside the gland negligible) in combination with the use of maximal stimuli. — Minor variations in the position of the electrode leading off from the gland and a variation in the size of the contact surface between the electrode and the gland did not affect the electrograms. — Deflections of the galvanometer caused by increased electronegativity of the surface of the gland, are called positive and have been recorded upwards in the illustrations, deflections caused by a reduced electronegativity of the surface of the gland are called negative and have been recorded downwards in the illustrations.

## Normal type of chorda and sympathetic electrogram.

In the normal chorda electrogram (fig. 4, p. 27; cf. also fig. 29 a and b, p. 90) the following phases can regularly be observed when stimulation has lasted 2—15 sec.: Latency about 0.25 sec. An initial positive wave (peak), the height of which is mostly about 2.5 mV. A smaller, slightly varying secondary positive wave. An almost straight slow ascent. A positive off-effect of varying height.

The normal sympathetic electrogram of the cat (fig. 19 a, p. 63; cf. also fig. 29 c, p. 90) has, like the chorda electrogram, a positive sign. The following phases can be observed regularly: Latency 0.3—0.6 sec. A positive ascent, which is retarded rapidly at the height of a few millivolts above the baseline, often after a distinct negative notch. A flat maximum, mostly after 5—10 sec. of stimulation. After the maximum, during continued stimulation, a slow reduction in the height of the curve to a certain low level near the baseline. After cessation of stimulation a return to the baseline without an off-effect.

### Analysis of components.

*The electrograms are made up of two components.* — In stimulating the chorda a monophasic, purely positive or purely negative deflection is obtained under certain conditions:

*Positive:* 1. After prolonged stimulation or repeated periods of stimulation (fig. 14 b, p. 54). 2. With weak stimuli (fig. 6 B a and b, p. 36). — *Negative:* 1. After prolonged stimulation or repeated periods of stimulation with compressed carotid vessels (fig. 14 d, p. 54). 2. After injection of small doses of atropine (fig. 12 a and c, p. 48). — Thus, a pure positive or a pure negative component can be isolated from the chorda electrogram, both of which are of about the same size.

In spite of the almost purely positive character of the normal sympathetic electrogram, a small negative deflection can be obtained in sympathetic stimulation: 1. In some cases after repeated periods of stimulation (fig. 20 b, p. 67). 2. After small doses of ergotamine (fig. 21 b, p. 67). — The sympathetic electrogram of dogs has a negative sign (fig. 29 d, p. 90). — These facts demonstrate the existence of a negative component, small in comparison to the positive, in the sympathetic electrograms of cats.

— *A negative component can be obtained in a pure form superimposed upon an existing positive component:* 1. If the chorda be

stimulated during sympathetic stimulation (fig. 23 a, p. 74), both stimuli here as always being maximal. 2. If stimulation of the chorda be renewed as soon as the off-effect of the previous excitatory period has reached its maximum (fig. 11 a p. 44).

This negative component is identical with the one isolated with atropine and compression of the carotids.

*Other types of interference between chorda and sympathetic stimulation:* 1. If a maximal sympathetic stimulation be superimposed upon a maximal chorda electrogram, no effect whatever is obtained (fig. 22, first part, p. 72). Thus the chorda has activated all the elements which could be reached by sympathetic stimulation. 2. Weak doses of eserine, which themselves do not elicit any effect, nevertheless sensitize the gland so that upon chorda stimulation a prolonged large after-effect of positivity is obtained (fig. 13 a, p. 50). A sympathetic stimulation thrown into this after-effect activates a small negative component (fig. 25, p. 75). This is the small negative component that the sympathetic electrogram contains and it is here in the isolated form.

From all these facts the following conclusions may be drawn: 1. The chorda and the sympathetic can maximally activate the same positive component, which in both cases must be produced by the same process in the gland. 2. The sympathetic activates a small part of the same negative component that is maximally activated by the chorda. 3. The interpretation of the composition of the chorda electrogram that is given by a synthesis of an isolated positive and an isolated negative component from the same experiment (fig. 17, p. 59) must be correct.

The initial positive wave of the chorda electrogram is started by the positive component which is then cut down by the negative component with its slightly longer latency and slower rate of development. The off-effect arises by algebraical summation owing to the fact that at cessation of stimulation the negative component rapidly swings back, whereas the positive one goes on to descend later and more slowly towards the baseline. The trough between the on- and off-peaks of fig. 4 (p. 27) illustrating the normal chorda response represents a large negative component superimposed on a positive one. The normal sympathetic response (fig. 19 a, p. 63) is a large positive component covering an insignificant negative one.

## Dependence of the electrograms on different variables.

The way in which the electrograms vary with different variables verifies the analysis of the components and can only be interpreted in the light of it.

*The chorda electrogram.* The two components vary mutually in different manner with different variables and agents: 1. Varied duration of stimulation (cf. table on p. 98, section No. 2 and fig. 5 a-f, p. 31). 2. Varied strength of stimulation (cf. table on p. 99, section No. 3 and figg. 6 and 7, pp. 35—37). 3. Varied frequency of stimulation (fig. 8, p. 40, the same effect as strength of stimulation). 4. Repeated periods of stimulation with intervals corresponding to the duration of the off-effects (cf. figg. 9 and 10, pp. 41—42). 5. The reaction of the positive component to repeated periods of stimulation changes after compression of the carotids, the reaction of the negative does not (cf. table on p. 99 section No. 4 and figg. 14 and 15, pp. 54—55).

6. Atropine: Doses of 0.1—0.3 mg extinguish the positive component and reduce the negative (fig. 12, p. 48). Slightly larger doses (0.5 mg) also extinguish the negative component.

7. Eserine: Weak eserine doses (fig. 13 a, p. 50) prolong the duration of the positive component after cessation of stimulation (the descending branch of the off-effect is prolonged). This prolonged off-effect is accompanied by a correspondingly prolonged after-secretion. — Slightly larger eserine doses (fig. 13 b, p. 50) affect the negative component in an analogous manner (the ascending branch of the off-effect is also prolonged).

*The sympathetic electrogram.* Both components in the sympathetic electrogram decrease rapidly with prolonged or repeated stimulation (fig. 28, p. 84). Small doses of atropine reduce the positive component in the electrogram. Eserine doses of 1 mg do not alter the electrogram.

## The components of the electrograms and rate of secretion.

The positive component runs parallel to the rate of secretion, (e.g. fig. 4, p. 27; fig. 13 a, p. 50; fig. 19 a, p. 63; fig. 20, p. 67). The positive component is always accompanied by a visible secretion, if it lasts longer than 2—3 sec.

The negative component is not accompanied by visible secretion, when activated without a simultaneous positive component

(fig. 12 a, p. 48). The introduction of the negative component on an existing positive component is, however, accompanied by an increase in the rate of secretion (fig. 13 c, p. 50 and fig. 23 a, p. 74).

These facts, in combination with the circumstance that the components react in a different manner to different variables, prove that the two components are caused by different processes in the gland.

### **Double innervation of the submaxillary gland in the light of its action potentials.**

The chorda and the sympathetic activate the same processes as defined by the potentials. Both components of the sympathetic electrogram are contained in the chorda electrogram. Earlier authors have shown that the action potentials of the gland are caused by its secretory cells. These facts lead to the following conclusion: *All secretory cells in the submaxillary gland that are innervated by the sympathetic are also innervated by the chorda.*

The positive component can attain the same height in the chorda and sympathetic electrograms. The negative component of the latter is much smaller than that of the former. — Acetylcholine, injected intra-arterially, activates both a strong positive and a strong negative component (fig. 26 a and b, p. 79). Adrenaline activates, apparently, only a positive component (fig. 27, p. 81).

In the case of anaemia in the gland, the positive component of the chorda electrogram assumes the properties that distinguish the positive component following sympathetic stimulation, which, (like adrenaline) causes anaemia in the gland.

When the processes generating the potentials are refractory to sympathetic stimulation, they are not refractory to chorda stimulation (fig. 28, p. 84).

— The facts mentioned lead to the following conclusions: *The chorda (acetylcholine) and the sympathetic (adrenaline) act synergistically on the process which produces a positive component. The course of this component (flow of saliva) and its duration are different in the two cases owing to the chorda (acetylcholine) and the sympathetic (adrenaline) acting antagonistically on other processes (probably the supply of oxygen), on which the positive component (rate of secretion) is dependent.* — The different size of the negative com-



ponent in the two electrograms is due to the chorda (acetylcholine) being able to activate a relatively larger negative component than the sympathetic (adrenaline).

### Electrogram and composition of saliva.

A comparison of the properties of the components of the electrograms under different conditions with the extensive literature on the variations in the composition of the saliva under similar conditions (see table on p. 98—99) has led to the following conclusion: *The positive component runs parallel to the secretion of water and salts. The negative component runs parallel to the secretion of organic matter (colloids).*

## XII. References.

- ANOCHIN, P. and A. ANOCHINA-IVANOVA, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1929. 222. 478.
- ANOCHIN, P. and B. LISAGOR, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1930. 225. 561.
- ANREP, G. V., *J. Physiol.* 1923. 57. 7.
- ANREP, G. V. and H. N. KAHN, *J. Physiol.* 1923—24. 58. 302.
- BABKIN, B. P., *Die äussere Sekretion der Verdauungsdrüsen*, 2. Aufl. Berlin 1928.
- BABKIN, B. P., *Nature* 1934. 134. 1005.
- BABKIN, B. P., G. W. STAVRAKY and A. ALLEY, *Amer. J. Physiol.* 1932. 101. 2.
- BARCROFT, J., *Ergebn. Physiol.* 1908. 7. 699.
- BAYLISS, W. M. and J. R. BRADFORD, *J. Physiol.* 1885. 6. XIII.
- BAYLISS, W. M. and J. R. BRADFORD, *Proc. Roy. Soc.* 1886. 40. 203.
- BAYLISS, W. M. and J. R. BRADFORD, *Internat. Monatschr. Anat. Physiol.* 1887. 4. 109.
- BECHER, E. and C. LUDWIG, *Z. rat. Med. N.F.* 1851. 1. 278.
- BECK, A. and L. ZBYSZEWSKI, *Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Série B.* 1912. 951.
- V. BEZNÁK, A., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1932. 229. 719.
- BEZNÁK, M. and E. FARKAS, *Quart. J. exp. Physiol.* 1937. 26. 265.
- BRADFORD, J. R., *J. Physiol.* 1887. 8. 86.
- BRADFORD, J. R., *J. Physiol.* 1888. 9. 287.
- BRONK, D. W. and R. GESELL, *Amer. J. Physiol.* 1926. 77. 570.
- CANNON, W. B. and McKEEN CATTELL, *Amer. J. Physiol.* 1916. 41. 39.
- CARLSON, A. J., *Amer. J. Physiol.* 1907. 19. 408.
- CARLSON, A. J., J. R. GREER and F. C. BECHT, *Amer. J. Physiol.* 1907—08. 20. 180.
- CARLSON, A. J. and F. C. McLEAN, *Amer. J. Physiol.* 1907—08. 20. 457.
- CHAUCHARD, A., B. CHAUCHARD and P. CHAUCHARD, *Arch. internat. Pharmacodynamie* 1937. 57. 241.
- DALE, H. H., *J. Physiol.* 1906. 34. 163.
- DALE, H. H. and P. P. LAIDLAW, *J. Physiol.* 1911—12. 43. 196.
- ECKHARD, C., *Eckhards Beiträge* 1860. 2. 205. Quoted from BABKIN (1928).
- EINTHOVEN, W. and W. A. JOLLY, *Quart. J. exp. Physiol.* 1908. 1. 373.
- ERLANGER, J., H. S. GASSER and G. H. BISHOP, *Amer. J. Physiol.* 1924. 70. 624.

- FELDFELD, W. and J. A. GUIMARAIS, *J. Physiol.* 1935 a. *83*. 43 P.  
 FELDFELD, W. and J. A. GUIMARAIS, *J. Physiol.* 1935 b. *85*. 15.  
 FLEMING, A. J. and F. C. MCINTOSH, *Amer. J. Physiol.* 1934. *109*. 36.  
 FLEMING, A. J. and F. C. MCINTOSH, *Quart. J. exp. Physiol.* 1935.  
*22*. 207.  
 FURTH, R., *Kolloid-Z.* 1933. *63*. 215.  
 GASELL, W. H., *The involuntary nervous system.* London 1920. 126.  
 Quoted from BARKIN (1928).  
 GAYDA, T., *Arch. di scienze biol.* 1924. *6*. 34.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1918—19 a. *47*. 411.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1918—19 b. *47*. 428.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1918—19 c. *47*. 438.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1920—21 a. *54*. 166.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1920—21 b. *54*. 185.  
 GESELL, R., *Amer. J. Physiol.* 1920—21 c. *54*. 204.  
 GIBBS, O. S. and H. H. McCLANAHAN, *J. Pharmacol.* 1937. *61*. 218.  
 GIBBS, O. S. and J. SZELÖCZEY, *J. Physiol.* 1932 a. *76*. 15 P.  
 GIBBS, O. S. and J. SZELÖCZEY, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 1932 b.  
*165*. 64.  
 GOLDENBERG, E. E., *J. Physiol.* 1924. *58*. 267.  
 GRANIT, R., *J. Physiol.* 1933. *77*. 207.  
 GRANIT, R. and L. A. RIDDELL, *J. Physiol.* 1934. *81*. 1.  
 GRANIT, R. and P. O. THERMAN, *J. Physiol.* 1934. *81*. 47 P.  
 GRANIT, R. and P. O. THERMAN, *J. Physiol.* 1935. *83*. 359.  
 GRANIT, R. and P. O. THERMAN, *J. Physiol.* 1937. *91*. 127.  
 V. HARREVELD, A., *Néerl. Tijdschr. Geneesk.* 1929 a. 749.  
 V. HARREVELD, A., *Proc. Roy. Acad. Amsterdam* 1929 b. *32*. 1370.  
 V. HARREVELD, A., *Arch. Néerl. Physiol.* 1929 c. *14*. 247.  
 V. HARREVELD, A., *Arch. Néerl. Physiol.* 1930 a. *15*. 23.  
 V. HARREVELD, A., *Arch. Néerl. Physiol.* 1930 b. *15*. 151.  
 V. HARREVELD, A., *Arch. Néerl. Physiol.* 1930 c. *15*. 413.  
 V. HARREVELD, A., *Arch. Néerl. Physiol.* 1930 d. *15*. 454.  
 V. HARREVELD, A., *Néerl. Tijdschr. Geneesk.* 1930 e. *74*. 2172.  
 HEIDENHAIN, R., *Stud. Physiol. Inst. Breslau*, 1868. *4*. 1.  
 HEIDENHAIN, R., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1872. *5*. 309.  
 HEIDENHAIN, R., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1878. *17*. 1.  
 HENRIESEN, V. E., *J. Pharmacol.* 1923. *21*. 99.  
 HOLZLOHNER, E., *Z. Biologie* 1931. *91*. 531.  
 HOLZLOHNER, E. and E. AIRAPETIANZ, *Z. Biologie* 1933. *93*. 491.  
 JAKYL, O., *Z. Zellforsch. mikr. Anat.* 1939. *30*. 156.  
 KELLER, R., *Ergebn. Physiol.* 1930. *30*. 294.  
 KELLER, R., *Die Elektrizität in der Zelle.* 3. Aufl. Mährisch-Ostrau 1932.  
 KIETYS, L. and J. MARTIN, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1937. *239*. 468.  
 KUFALOFF, P. S. and S. V. SKIPIN, *Fiziol. Ž.* 1934. *17*. 1301. Quoted  
 from *Ber. ges. Physiol.* 1935. *53*. 521.  
 LANGLEY, J., *J. Physiol.* 1878. *1*. 96.

- LANGLEY, J., *J. Physiol.* 1885. 6. 71.
- LANGLEY, J., *J. Physiol.* 1889. 10. 291.
- LANGLEY, J., *J. Physiol.* 1890. 11. 123.
- LANGLEY, J., *J. Physiol.* 1901—02. 27. 237.
- LANGLEY, J. and H. FLETCHER, *Philos. Trans.* 1890. 180 B. 109.
- LANGSTROTH, G. O., D. R. McRAE and G. W. STAVRAKY, *Proc. Roy. Soc.* 1938 a. 125. 335.
- LANGSTROTH, G. O., D. R. McRAE and G. W. STAVRAKY, *Arch. internat. Pharmacodynamie* 1938 b. 58. 61.
- McINTOSH, F. C. and H. E. RAWLINSON, *Amer. J. Physiol.* 1934. 109. 70.
- McINTOSH, F. C. and H. E. RAWLINSON, *Quart. J. exp. Physiol.* 1935. 25. 199.
- MALTESOS, C. and R. WEIGMANN, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1939. 241. 641.
- MOLOY, H. C. and I. H. SMITH, *Anat. Rec.* 1930. 45. 377.
- MORITA, M., *Nagasaki Igakkwai Zassi* 1935. 13. 396. Quoted from *Ber. ges. Physiol.* 1936. 90. 614.
- NORTHRUP, D., *Amer. J. Physiol.* 1935. 114. 46.
- PESERICO, E., *Arch. Ital. biol.* 1926. 77. 88.
- PESERICO, E., *Arch. di scienze biol.* 1927. 9. 184.
- RABL, C., *Z. Biologie* 1922. 76. 289.
- RAWLINSON, H. E., *Anat. Rec.* 1933. 57. 289.
- RAWLINSON, H. E., *Anat. Rec.* 1935 a. 63. 295.
- RAWLINSON, H. E., *J. Anat.* 1935 b. 70. 143.
- RAWLINSON, H. E., *Quart. J. exp. Physiol.* 1936. 26. 79.
- ROSENBLUETH, A., *Amer. J. Physiol.* 1932. 102. 12.
- ROSENBLUETH, A., A. FORBES and E. LAMBERT, *Amer. J. Physiol.* 1933. 105. 508.
- SCHAEFER, H., *Elektrophysiologie I.* Wien 1940.
- SCHAEFER, H. and H. GÖPFERT, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1937. 238. 404.
- SECKER, J., *J. Physiol.* 1934 a. 81. 81.
- SECKER, J., *J. Physiol.* 1934 b. 82. 293.
- SECKER, J., *J. Physiol.* 1936. 86. 22.
- STAVRAKY, G. W., *Amer. J. Physiol.* 1940. 129. 539.
- STORMONT, D. L., *Special cytology by E. V. Cowdry. Section VI. The salivary glands.* New York 1932. 151.
- TOENNIES, J. F., *Rev. Sci. Instr.* 1938. 9. 95.
- WEDENSKY, N., *C. r. hebdom. seánc. Acad. Sci. Paris*, 1892. 115. 1103.
- WERTHER, M., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1886. 38. 293.
- WOLFF, H. G., McKEEN CATTELL and D. A. CLARK, *Amer. J. Physiol.* 1934. 109. 375.



ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA  
VOL. 2. SUPPLEMENTUM VII

---

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.

STUDIEN ÜBER DEN  
NAHRUNGSPHYSIOLOGISCHEN WERT  
DER WEIZENKLEIE

UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG  
DER BEDEUTUNG DER ERHITZUNG

VON

STIG BORGSTRÖM

LUND



## Vorwort.

Die vorliegende Untersuchung ist in den Jahren 1938—40 am Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund entstanden. Sie wurde angeregt vom Vorstand des Instituts, Herrn Professor Dr. ERIK WIDMARK. Für wertvolle Anleitung bei Planung und Ausführung der Arbeit, für seine guten Ratschläge und fruchtbringenden Aussprachen sowie für sein mir stets erwiesenes persönliches Wohlwollen sage ich ihm meinen ehrerbietigen und herzlichen Dank.

Die für die Arbeit notwendigen Duodenalsondierungen sind an der hiesigen Medizinischen Klinik gemacht wurden. Dem Direktor der Klinik, Herrn Professor Dr. SVEN INGVAR, bin ich hierfür sowie für das wohlwollende Interesse, das er meiner Arbeit erzeigt hat, sehr zu Dank verpflichtet.

Dozent Dr. GRETA HAMMARSTEN hat meine Arbeit mit guten Ratschlägen und wertvoller Kritik begleitet, wofür ich ihr herzlich danke.

Von meinen Freunden seien besonders die herzlich bedankt, die sich mir in aufopfernder Weise als Versuchspersonen zur Verfügung gestellt haben.

Frau Fil. mag. MARIT NEYMARK hat die zahlenmässige Bearbeitung des Materials kontrolliert, wofür ich ihr sehr dankbar bin. Herrn ERNST BLAUERT danke ich für die deutsche Übersetzung. Fräulein Fil. lic. KARIN HAGNELL hat mir beim Lesen der Korrektur wertvolle Hilfe geleistet, wofür ich ihr herzlichen Dank sage.

Frau MARGARETA LINDERSTAM, Fräulein IDA HALLIN und Fräulein STINA OHLSSON, welche die Versuchstiere versorgt und an



der technischen Arbeit teilgenommen haben, danke ich für ihre gewissenhafte und aufopfernde Hilfe.

Die Untersuchung wurde teilweise durch Kungl. Fysiografiska Sällskapet i Lund und Svenska kvarnföreningen geldlich unterstützt, wofür ich geziemend danke.

Lund, im April 1941.

*Stig Borgström*

## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
EINLEITUNG UND GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK .....	7
ZIELSETZUNG .....	25
EXPERIMENTELLES .....	27
Kap. I. VERDAUUNGSVERSUCHE IN VITRO .....	27
A. Die Auslösbarkeit der Stickstoffprodukte aus Weizenkleie .....	28
1. Verdauungsversuche ohne Erneuerung der Verdauungsflüssigkeit .....	28
2. Verdauungsversuche mit menschlichem Magen- und Duodenalsaft .....	32
3. Verdauungszeit und N-Auslösung .....	34
4. Dauer der Hitzeeinwirkung und ausgelöste N-Menge .....	36
5. Grad der Erhitzung und ausgelöste N-Menge ....	37
6. Verdauungsversuche mit fortlaufender Erneuerung der Verdauungsflüssigkeit .....	38
7. Verdauungsversuche mit Weizengluten .....	39
Zusammenfassung .....	40
B. Die Auslösbarkeit des Calciums und Magnesiums aus Weizenkleie .....	41
1. Verdauungsversuche ohne Erneuerung der Auslösungsflüssigkeit .....	41
2. Verdauungsversuche mit ständig erneuerter Auslösungsflüssigkeit .....	44
Zusammenfassung .....	45
Kap. II. TIERVERSUCHE .....	47
A. Wachstumsversuche .....	51
1. Versuche mit Weizenkleie allein .....	52
2. Versuche mit Weizenkleie + 1% Fischlebertran .....	53
3. Versuche mit Kostmischungen .....	54
Zusammenfassung .....	58
B. Bilanzversuche .....	59
1. Aufgenommene Nahrungsmenge .....	61
2. Fäkalienmenge .....	62
3. Die Resorption der Weizenkleie .....	65
Zusammenfassung .....	66

	Seite
4. Stickstoffumsatz .....	66
a. Mit den Faeces ausgeschiedene Stickstoffmenge	67
b. Im Organismus verbleibender Stickstoff .....	69
Zusammenfassung .....	71
5. Calcium- und Magnesiumstoffwechsel .....	72
a. Der Calcium- und Magnesiumverlust mit den Faeces .....	73
b. In Organismus verbleibendes Calcium und Magnesium .....	75
Zusammenfassung .....	82
C. Der Einfluss der Erhitzung auf das Vitamin B <sub>1</sub> der Weizenkleie .....	83
Zusammenfassung .....	87
Kap. III. VERSUCHE AN MENSCHEN .....	88
A. Menge der Faeces .....	92
Zusammenfassung .....	94
B. Der Stickstoffumsatz .....	95
1. Der Stickstoffverlust mit den Faeces .....	95
2. Die Stickstoffbilanz .....	97
Zusammenfassung .....	98
C. Der Calcium- und Magnesiumstoffwechsel .....	99
1. Der Calcium- und Magnesiumverlust mit den Faeces .....	100
2. Die Calcium- und Magnesiumbilanz .....	101
Zusammenfassung .....	103
ANALYSENMETHODEN .....	104
VERSUCHSERGEBNISSE UND BESPRECHUNG .....	105
ZUSAMMENFASSUNG .....	111
SUMMARY .....	118
ANGEFÜHRTE LITERATUR .....	124

## Einleitung und geschichtlicher Überblick.

Die während der letzten fünfzig Jahre in starker Entwicklung begriffene Mühlenindustrie hat mit ihren grossen technischen Hilfsmitteln das Mahlverfahren zunehmend vervollkommet. Man erhält jetzt ein weisses, wohlschmeckendes und gut backfähiges Mehl von höherer Reinheit und gleichmässigerer Beschaffenheit, als es die primitiveren Mühlen älterer Zeiten mit ihren beschränkten Mitteln herzustellen vermochten.

Wenn das Korn beim Mahlprozess u. a. von seinen äusseren, holzigen Bestandteilen befreit worden ist, werden diese als Kleie abgetrennt. Die Kleie dient bekanntlich in der Hauptsache als Viehfutter. Je höher der Ausmahlungsgrad, eine um so grössere Menge Mehl liefert eine bestimmte Menge Getreide, und um so gröber ist das Mehl; sein Gehalt an holzigen Bestandteilen nimmt zu. In Wort und Schrift wirbt man eifrig für das grobe Brot, d. h. Brot aus Mehl mit hohem Ausmahlungsgrad, als menschliche Nahrung. Ist diese Propaganda richtig und fusst sie auf vom nahrungsphysiologischen Gesichtspunkt aus zutreffenden Voraussetzungen?

Der wichtigste Unterschied zwischen dem feinen und dem groben Brot liegt, wie schon angedeutet, darin, dass das feine Brot eine geringere Menge holziger Bestandteile, also weniger Kleie, enthält. Die Frage der nahrungsphysiologischen Überlegenheit des groben Brotes gegenüber dem feinen wäre also gleichbedeutend mit der Frage nach dem nahrungsphysiologischen Wert der Kleie. In Betracht kommen hier natürlich die Kleien unserer Brotgetreidesorten, also Weizen- und Roggenkleie. Aus Gründen der Stoffbegrenzung untersucht die vorliegende Arbeit jedoch nur die Weizenkleie. Die Wahl fiel auf diese, da der Weizen das im grössten Ausmass angebaute und zur menschlichen Nahrung dienende Getreide in Schweden ist (Statistisk årsbok för Sverige; 1940, Sveriges officiella statistik, Årsväxten, 1940).

Synthese und Abbau der Citronensäure nicht genügender Geschwindigkeit. Diese Kritik ist als völlig widerlegt anzusehen (KREBS u. EGGLESTON 1940, KREBS 1940 a). BREUSCH (1939) will zudem geltend machen, diese Citronensäuresynthese erfolge nur in Nierengewebe. Andere Forscher (Literatur siehe bei KREBS u. EGGLESTON 1940, SMYTH 1940, HALLMAN 1940) hingegen haben diese Citronensäurebildung in mehreren anderen Geweben festgestellt, u. a. in Herz- und Skelettmuskulatur Leber, Hoden.

STARE u. BAUMANN (1940 a) haben vor kurzem Krebs' Theorie des Citronensäurezyklus stark kritisiert. Diese Kritik wird zum grössten Teil durch die später von Krebs und seinen Mitarbeitern veröffentlichten Versuche entkräftet (KREBS u. EGGLESTON 1940, KREBS 1940 b, SMYTH 1940).

Alle hier referierten Versuche über den Citronensäurezyklus sind *in vitro* an Schnitten, Brei oder Extrakten verschiedener Gewebe ausgeführt worden. Versuche, den Citronensäurezyklus einwandfrei unter durchaus physiologischen Bedingungen nachzuweisen (in vivo, am ganzen Tier oder bei Organperfusion), sind misslungen. Die Metaboliten des Citronensäurezyklus rufen zwar am ganzen Tier eine gesteigerte Citronensäureausscheidung mit dem Harn und eine erhöhte Citronensäurekonzentration im Blut hervor (ORTEN u. SMITH 1937, KREBS, SALVIN u. JOHNSON 1938). Indessen sind diese Ergebnisse, wenigstens was die Apfelsäure anlangt, kein Beweis des Citronensäurezyklus, wie durch nähere Analyse der Versuchsbedingungen festgestellt worden ist (MÄRTENSSON 1940).

Tatsachen, welche direkt bestätigten, dass  $\alpha_1$ -Diketo adipinsäure (TOENNISSEN u. BRINKMANN 1930) oder Buttersäure (BLIXENKRONE-MÖLLER 1938) die physiologische Muttersubstanz der Bs wäre, sind bisher nicht vorgelegt worden.

Alle referierten Versuche sind *in vitro* ausgeführt. Mit einer Ausnahme (MOYLE 1924, NEEDHAM 1927, siehe S. 7) waren es „Belastungsversuche“, d. h. ein Stoff wird dem Enzympräparat zugesetzt, wobei man die Umsetzung dieses Stoffes oder die dabei gebildeten Stoffe studiert. Die Schlussfolgerungen hinsichtlich physiologischer Verhältnisse, die sich aus solchen Experimenten ziehen lassen, sind selbstverständlich begrenzt. Man kann daraus keine direkten Schlüsse in bezug auf den Stoffwechsel intakter Gewebe (in vivo) ziehen. Dies wird allzuoft vergessen, trotzdem mehrere Autoren es betonen (THUNBERG 1920, SZENT-GYÖRGYI 1937, WIELAND et al. 1939). Wieland

TABELLE 1.

	Weizenkleie	»Patent flour«
	%	%
Gesamtproteine	15,60	12,75
Gliadin	2,73	6,71
Globulin	5,87	1,86
Glutenin	7,00	4,18

TABELLE 2.

	Weizenkleie		
	Albumin	Globulin	Prolamin
	%	%	%
Cystin	3,29	1,52	2,29
Histidin	2,57	2,76	0,84
Tryptophan	4,76	2,85	1,37
Arginin	10,04	14,13	4,41
Lysin	4,51	11,84	2,45
Tyrosin	4,20	3,69	3,38

Weizenkleie aus. Tabelle 2 gibt den Gehalt dieser Eiweissstoffe an verschiedenen Aminosäuren an. TELLER und TELLER (1932) finden ausser den ebengenannten Proteinen in der Weizenkleie auch Glutelin, ein in 0,2% igem kaltem Natriumhydroxyd unlösliches Protein sowie Reststickstoff.

Das Protein der Weizenkleie ist durch seinen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren gekennzeichnet. Die ansehnliche Menge hochwertiger Aminosäuren spricht ebenfalls für den Nährwert des Kleieiweisses (JONES und GERSDORFF, 1925). Bei einem Vergleich zwischen den Aminosäuren der Kleie und des Weizenendosperms geben MURPHY und JONES (1926) die in Tabelle 3 verzeichneten Werte an.

TABELLE 3.

Pro 100 g	g Cystin	Arginin	Histidin	Lysin	Tryptophan
Weizenkleie	0,25	0,85	0,18	0,54	0,28
Weizenendosperm	0,14	0,36	0,20	0,23	0,12

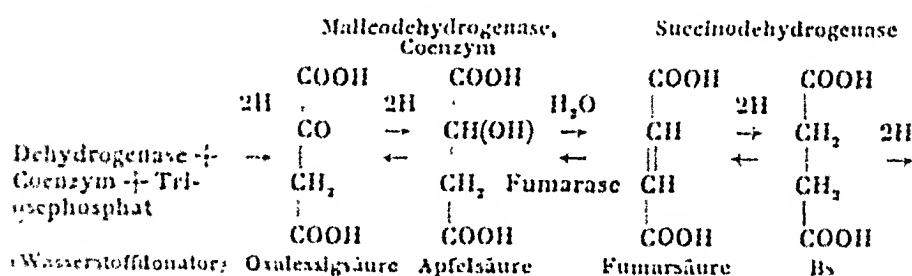
Wie gesagt, betrachtet LEHNARTZ das Glutenin als einen vollwertigen Eiweissstoff. ABELIN (1929) hingegen ist der Ansicht, dass die Histidin-, Arginin- und Lysinmenge zu klein sei. JONES und GERSDORFF (1925) vergleichen die prozentuale Menge der Aminosäuren in Weizenkleieprotein und Kasein und finden eine

Fumarsäure. Darauf wird die gebildete *Apfelsäure* dehydriert und Oxallessigsäure wiedergebildet. Als Wasserstoffacceptor fungiert über das Protoflav) *Fumarsäure*, die mit Hilfe der Succinodehydrogenase zu Bs reduziert wird. Es wird also mit anderen Worten Apfelsäure-Fumarsäure zu Oxallessigsäure und Bs „dismutiert“. Die gebildete *Bernsteinsäure* wird dehydriert, es bildet sich erneut Fumarsäure und der dabei freiwerdende Wasserstoff wird auf das Cytochrom C übertragen. Auf dem Wege über Cytochrom und Cytochromoxydase gelangt der Wasserstoff an den endgültigen Wasserstoffacceptor, den Sauerstoff.

Die obengenannten vier Säuren — alle enthalten 4 Kohlenatome, weshalb Szent-Györgyi sie die  $C_4$ -Säuren nennt, — dienen also als Katalysatoren beim Wasserstofftransport. Der „Strom“ von Wasserstoff, der bei der Geweboxydation von den Wasserstoffdonatoren zum Sauerstoff geht, passiert nach Szent-Györgyi zum allergrössten Teil das  $C_4$ -Säurensystem. Die  $C_4$ -Säuren schwingen dabei zwischen reduzierten und oxydierten Formen.

Die Succinodehydrogenase und Malicodehydrogenase sind nach Szent-Györgyi keine Dehydrogenasen, sondern H-Transportasen, wobei Fumarsäure und Apfelsäure-Oxallessigsäure eher die prosthetischen Gruppen dieser Enzyme als ihre Substrate sind.

Szent-Györgyis Theorie kann durch folgendes Schema veranschaulicht werden:



Szent-Györgyis Theorie hat einige Kritik hervorgerufen, ist aber überraschenderweise ziemlich allgemein angenommen worden (siehe z. B. STERN 1940, FRANKE 1940, KREBS u. EGGLESTON 1940, KUTSCHER u. SARREITER 1940). Ich werde zunächst die wichtigsten Tatsachen anführen, worauf Szent-Györgyi seine Theorie stützt, dann ganz kurz auf die Kritik eingehen und auch einige eigene kritische Gesichtspunkte vortragen.

*Tatsachen zur Stütze der  $C_4$ -Säurenkatalyse* (hauptsächlich

TABELLE 4.

		Biologischer Wert		
Weizenkleie	59	62	63	57
»Patent flour»	57	61	56	44

körner mit 85 ermittelt. Dass diese Methode mit einem ziemlich hohen prozentualen Fehler arbeitet, zeigen vielleicht am deutlichsten die Werte für »patent flour». Bei der Bestimmung des biologischen Wertes hat es sich als sehr wichtig erwiesen, wie viel Protein in der Versuchskost enthalten ist. Bei niedrigem Proteingehalt der Versuchskost erhält man einen höheren biologischen Wert, als wenn die Kost einen höheren prozentualen Anteil Protein hat (MITCHELL, 1923—24). So zeigen CHICK, BOAS-FIXSEN, HUTCHINSON und JACKSON (1935), dass der biologische Wert für Vollweizen und Milch 100 bzw. 89 ist, wenn die Kost 3—4 % des Proteins des fraglichen Nährstoffes enthält. Steigert man hingegen den Eiweissgehalt auf 5—7 %, so betragen die entsprechenden Werte 68 und 86.

#### Die Salze der Weizenkleie.

BURKARDT (1934), der für das Vollkornbrot wirbt, gibt folgende Werte für die Salze in diesem Brot, verglichen mit Weissbrot, an (Tab. 5).

TABELLE 5.

Gehalt an Oxyd (mg %)	Chlor	Kalium	Natrium	Cal- cium	Mag- nesium	Eisen	Man- gan	Phos- phor	Schwe- fel
Vollkornbrot	44	376	14	94	100	5	11	593	325
Weissbrot	10	114	22	15	15	3	3	275	179

Diese beiden Brotsorten weisen also besonders grosse Unterschiede hinsichtlich des Gehaltes an Calcium und Magnesium auf. Eine entsprechende Analyse der gesamten Asche und einiger Salze in Weizen und Weizenkleie haben HARDING und DYSTERHEFT (1927) ausgeführt (Tab. 6).

TABELLE 6.

	Asche %	Eisen mg %	Calcium mg %	Magnesium mg %	Phosphor mg %
Weizen	1,761	1,84	31,7	154,3	384
Weizenkleie	4,868	5,50	96,5	450,5	1134



5mal stärkere Malonatkonzentration als für die entsprechende Hemmung der Bs-Dehydrierung erforderlich (DAS 1937). Szent-Györgyi zieht daraus folgenden Schluss: Bei Malonathemmung wird die zugesetzte Fumarsäure mit Wasserstoff von den Wasserstoffdonatoren hydriert. Wegen der starken Malonathemmung der Bs-Dehydrierung kann die dabei gebildete Bs nicht (oder nur zu einem geringen Teil) dehydriert werden und deshalb keine Neubildung von Fumarsäure erfolgen. Der Sauerstoffverbrauch hört somit auf, wenn die zugesetzte Fumarsäure verbraucht und als Bs fixiert ist. Literatur: SZENT-GYÖRGYI (1937 b) S. 22.

5. *Oxydation von Fumarsäure und Reduktion von Oxalessigsäure*: Zugesetzte Fumarsäure wird von Muskulatur *in vitro* zu Oxalessigsäure oxydiert, letztere kann mit Hydrazin fixiert werden. Auch Glutaminsäure reagiert schnell mit Oxalessigsäure und kann als Abfangmittel dienen. — Praktisch alle *in vitro* zugesetzte Oxalessigsäure wird nach kurzer Zeit als Apfelsäure und Fumarsäure wiedergefunden. Literatur: BANGA (1936), S. 130, BANGA u. SZENT-GYÖRGYI (1937).

Fumarsäure und Apfelsäure wurden nach STRAUB (1935) analysiert.

6. *Die Kohlehydratverbrennung wird durch die C<sub>4</sub>-Säuren katalysiert*: Die respiratorische Quote bei Malonathemmung *in vitro* steigt nach Zusatz von Fumarsäure gegen 1 an. Nach Szent-Györgyi deutet dies an, dass die Kohlehydratverbrennung (bei der die RQ = 1) von den C<sub>4</sub>-Säuren katalysiert wird. Literatur: BANGA (1936), s. 136, SZENT-GYÖRGYI (1936) S. 110.

7. *Der Wasserstoffdonator bei der C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse*: Nach Szent-Györgyi ist bei Versuchen *in vitro* Triosephosphat normal der wichtigste Wasserstoffdonator für die C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse. Das Triosephosphat wird dabei zu Brenztraubensäure oxydiert. Literatur: LAEI (1936) S. 142, SZENT-GYÖRGYI (1936) S. 112—113, BANGA (1937 a).

8. *C<sub>4</sub>-Säurenkatalyse in verschiedenen Geweben*: Die oben referierten Versuche sind grösstenteils mit zerkleinerter Brustmuskulatur der Taube oder mit Extrakt desselben Materials ausgeführt. Ferner hat man andere Gewebe, auch von anderen Tieren, *in vitro* untersucht. Dabei wurden bei im ganzen gleichbleibender Methodik in der Hauptsache folgende Befunde erhoben: a) Der Sauerstoffverbrauch steigt nach Zusatz von Fumarsäure, die dabei nicht eliminiert wird. b) Malonsäure hemmt den Sauerstoffverbrauch im selben Grade wie Cy.

g und B<sub>2</sub> auf 4,40  $\gamma$  pro g. Nach denselben Autoren sind die entsprechenden Zahlen für Weizenkleie nach 73 %iger Ausmahlung 5,85  $\gamma$  Vitamin B<sub>1</sub> und 2,80  $\gamma$  Vitamin B<sub>2</sub>. Feines Mehl und daraus gebackenes Brot enthält wenig Vitamin B (Tab. 7).

Ausser den hier genannten Vitaminen soll Weizenkleie einen wachstumsfördernden Faktor (KOLLATH, 1933) und einen die Hämoglobinbildung fördernden organischen Bestandteil (ROSE und VAHLTEICH, 1932) enthalten.

### Rohfaser der Weizenkleie.

Mit der Kleie werden der Nahrung nicht nur Eiweissstoffe, Salze und Vitamine zugeführt, sondern auch Rohfaser, d. h. Zellulose (RUBNER, 1918).

Zellulosezerlegende Enzyme werden im menschlichen Darmkanal nicht ausgeschieden (v. NOORDEN und SALOMON, 1920;

TABELLE 8.

Weizenkleie		
Autor:	Ausmahlungsprozent	Rohfaser (%)
Hindhede (1916)	70—96	5,48
Johansson (1917)	75—100	7,4
Neumann (1923)	80—89	9,75
Neumann (1923)	89—93	11,33

MANGOLD, 1928). Dagegen vermögen Bakterien die Zellulose abzubauen. Zellulosespaltende aerobe Bakterien konnte z. B. LAWRYNOWICZ (1936) in den Faeces von 25 unter 100 untersuchten Personen nachweisen.

Der Gehalt der Weizenkleie an Rohfaser ist aus Tabelle 8 ersichtlich. Die Rohfasermenge nimmt zu, die Kleie wird um so gröber, je mehr Mehl aus dem Getreide ausgemahlen wird.

### Die Ausnützung der Weizenkleie im Darmkanal.

Die oben angegebenen Werte der in Weizenkleie und Mehlprodukten enthaltenen Stoffe sind natürlich nicht als absolut zu betrachten. Sie bezeichnen vielmehr nur das, was jeder einzelne Forscher in den von ihm untersuchten Proben gefunden hat. Da, wie schon gesagt, Weizenkleie ein Begriff ist, der keinen absolut begrenzten Teil des Weizenkorns deckt, und da die Menge der hier in Rede stehenden Stoffe des Weizens nicht nur zwi-

tion. Gewaschene Taubenbrustmuskulatur wird mit der so vorbehandelten Analysenprobe versetzt. Die dabei verbrauchte Sauerstoffmenge wird mit dem Sauerstoffverbrauch nach Zusatz einer bekannten Menge Bs unter sonst identischen Versuchsbedingungen verglichen. Hierdurch wird die in der Probe vorhandene Bs-Menge berechnet. — Die Oxydation mit Permanganat bewirkt indessen, dass einige Stoffe zu Bs oxydiert werden. So wird  $\alpha$ -Ketoglutar säure unter diesen Versuchsbedingungen quantitativ zu Bs umgewandelt, so dass also mit dieser Methode Bs  $\div$   $\alpha$ -Ketoglutar säure bestimmt werden. Unter gewissen Umständen kann dies eine wichtige Fehlerquelle ausmachen (KREBS 1940 b, S. 777—778).

Bei der Bestimmung der Fumarsäure hat man mit zwei Methoden gearbeitet. Die zuerst ausgearbeitete (STRAUB 1935) umfasst Eiweissfällung, Ätherextraktion, Beseitigung des Äthers und Lösung des restlichen Extraktes in Wasser. Die wässrige Lösung wird mit Permanganat titriert. Durch Vergleich mit dem Permanganatverbrauch reiner Fumaratlösungen wird die Fumarsäurekonzentration in der Analysenprobe berechnet. Mit dieser Methode bestimmt man also ausser Fumarsäure alle aus saurer Lösung ätherextrahierbaren Stoffe, die Permanganat verbrauchen, d. h. alle ätherlöslichen, ungesättigten Säuren. Auch Malonsäure wird durch Permanganat oxydiert. Die Spezifität der Methode ist also schlecht. — Szent-Györgyi liess später in seinem Institut eine neue Methode zur Bestimmung von Fumarsäure ausarbeiten (SZEGEDY 1937 a). Diese Methode umfasst Eiweissfällung und Ätherextraktion wie oben. Aus der wässrigen Lösung der ätherextrahierten Stoffe wird Fumarsäure als Mercuriofumarat ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, gewaschen, und das Mercuriofumarat wird in Natriumfumarat übergeführt. Eine bekannte Menge Brom (als Bromwasser) wird zugesetzt, wobei die Fumarsäure quantitativ zu Dibrombernsteinsäure bromiert wird. Der Bromverbrauch gibt die vorhandene Fumarsäure-Menge an. Der prinzipielle Unterschied zwischen dieser und der ersteren Methode ist nur der, dass zwischen die Ätherextraktion und die Titration auf die Menge ungesättigter Substanz das Füllen der Fumarsäure als Mercuriofumarat eingeschoben ist. Diese Methode gestattet eine etwas höhere Spezifität als die vorige, da hier alle ätherlöslichen, ungesättigten Säuren, die schwerlösliche Mercuriosalze geben, bestimmt werden. SZEGEDY (1937 b) hat mit dieser Methode nur Fumarsäurebestimmungen in Gegenwart von Bs, Apfelsäure, Brenz-

dem »Anschlagwert« (FRIEDBERGER und SEIDENBERG, 1927) und dem »Sättigungswert« (KESTNER, 1922), teils dadurch, dass die Bedeutung der Weizenkleie als Anteil der Nahrung unter verschiedenen Gesichtswinkeln gesehen wird. Der eine Forscher unterstreicht mehr die eine Eigenschaft der Weizenkleie, der andere misst einer anderen grösseres Gewicht bei.

#### Die Ausnützung des Eiweisses der Weizenkleie.

Die älteren Untersuchungen über die Ausnützung der Kleie richteten das Hauptaugenmerk auf den Verlust an Stickstoffprodukten, Asche und Trockensubstanz durch die Fäkalien. POGGIALE (1853), der als erster die Verdaulichkeit der Kleie untersucht hat, fand durch Faeces-Analysen, nachdem er zwei Hunde und ein Huhn hintereinander mit einer und derselben Menge Kleie gefüttert hatte, dass 56 % der Kleiensubstanz und ein grosser Teil der Stickstoffprodukte nicht verdaulich waren. Er zieht daraus den Schluss, dass die Kleie zweckmässig vom Mehl zu scheiden sei. RUBNER, der Forscher, der vielleicht am meisten auf diesem Gebiete gearbeitet hat, führte einen grossen Teil seiner Untersuchungen an Menschen aus. Aus seinen früheren Arbeiten (1879, 1883) zieht er den Schluss, »dass, ausschliesslich vom Standpunkte der Ausnützung im Darm aus betrachtet, gegen die Verwendung der Kleie zur menschlichen Ernährung kein Einwand zu erheben ist, und dass sich unter geeigneter Zubereitung eine nicht unbeträchtliche Menge von Nahrungstoffen aus derselben resorbieren lassen«. Doch fügt er hinzu: »... geben aber die Zweckmässigkeit der Verwendung nur für die Fälle zu, in denen sonst dieselbe unverwerthet lag«. Fortgesetzte Untersuchungen über die Ausnützung von Weizen und Roggen bei verschiedenen Ausmahlungsgrad bringen RUBNER jedoch in zunehmenden Masse zu der Ansicht, dass die Verdauungssäfte die Membranen der Kleie nicht zu durchdringen vermögen (1915). Im Jahre 1916 schreibt er auch: »Alle sonstigen aussergewöhnlichen grossen Verluste, wie wir sie bei anderen Broten sehen, sind die Wirkung der beigefügten Kleie«. Das feine Brot eignet sich somit am besten zur menschlichen Nahrung, und die Kleie hat nur Bedeutung für Personen mit träger Verdauung (RUBNER, 1925). Zur selben Ansicht wie RUBNER sind mehrere andere Forscher gelangt (u. a. MAURIZIO 1924, MOHS 1937, MOELLER 1897, PLAGGE und LEBBIN 1897, WICKE 1890). PLAGGE

entscheiden, welche Rolle diese beiden Säuren bei der Bestimmung von Apfelsäure unter den von Szent-Györgyi zur Anwendung gebrachten Versuchsbedingungen haben spielen können. Das Vorkommen dieser beiden Säuren unter verschiedenen Verhältnissen ist nämlich noch wenig erforscht. — Ebenso wie bei der Fumarsäurebestimmung hat man auch bei der Bestimmung von Apfelsäure eine Korrektur für die Adsorption von Apfelsäure an den Eiweissniederschlag eingeführt. Die Verluste schwanken hier zwischen 15 und 40 % (STRAUB 1936, S. 125).

*Kritik der oben angegebenen Versuche (S. 11—15), die Szent-Györgyi als Stütze seiner Theorie anzieht:*

ad 1. Nach dem, was oben über die zur Anwendung gebrachte Methodik gesagt wurde, muss man bei Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen von Fumarsäure- und Apfelsäurebestimmungen vorsichtig sein. — Nach Versuchen mit Muskulatur *in vitro* wird alle zugesetzte „Fumarsäure“ wiedergefunden. Dies kann darauf beruhen, dass eine andere ätherlösliche, ungesättigte Säure gebildet worden ist und das Analysenergebnis somit nicht auf Fumarsäure beruht. Aber das Versuchsergebnis kann auch anzeigen, dass Eliminierung und Bildung von Fumarsäure und Apfelsäure etwa mit gleicher Geschwindigkeit erfolgen. Dass zugesetzte Fumarsäure oder Apfelsäure nicht verbraucht wird, braucht also nicht auf  $C_4$ -Säurenkatalyse hinzudeuten.

STARE u. BAUMANN (1940 a) haben gefunden, dass neben  $B_5$ , Fumarsäure und Apfelsäure auch  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Citronensäure und Glutaminsäure einen Katalyseneffekt auf die Atmung von Muskulatur *in vitro* hervorrufen können. Die Glutaminsäure hat unter diesen sechs Säuren die stärkste Wirkung. Nach Ansicht der genannten Autoren ist die Wirkung der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Citronensäure und Glutaminsäure vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Muskulatur aus diesen Stoffen  $C_4$ -Säuren bildet, die dann diesen Katalyseneffekt hervorrufen. Für die Citronensäure ist schon früher auf diese Möglichkeit hingewiesen worden (BREUSCH 1937, ELLIOTT u. ELLIOTT 1939). Nach Stare und Baumann bewirkt aber Glutaminsäure eine stärkere Zunahme der Atmung, als die entsprechende Konzentration der  $C_4$ -Säuren, die nach dieser Theorie die eigentliche Ursache des Effektes der Glutaminsäure auf die Atmung sein sollen.

ad 2. WEIL-MALHERBE (1937) hebt hervor, dass Malonat nicht spezifisch hemmend auf Succinodehydrogenase ein-

TABELLE 9.

Autor:	Ausmahlungs- prozent	Verdaut (%)	
		Stickstoff	Gesamtmenge
Hindhede, feingemahlene Kleie (1929)	70—100	70	77 org. Substanz
Hindhede, grobgemahlene Kleie (1929)	70—100	42	67 » »
Johansson (1917)	75—100	49	59 Kal.
Rubner (1883)	0—100	70	88 Trockensubstanz
Rubner (1883)	0—30	79	96 »

### Der Einfluss der Rohfaser auf die Ausnützung des Eiweisses der Weizenkleie.

Die Bedeutung der Rohfaser in der Nahrung ist umstritten. Durch ihre Fähigkeit, Wasser aufzunehmen, wirkt sie abführend und reinigt den Darm bei Fäulnisdyspepsien und krankhaften Verschiebungen der Bakterienflora. Beim Übergang von schlackenarmer Kost zu »Kleiekost« treten jedoch oft Diarrhoen auf, die aber verschwinden, nachdem der Darm sich an die gröbere Kost gewöhnt hat (BURKARDT, 1934). COWGILL und ANDERSON (1932), die die abführende Wirkung der Weizenkleie untersucht haben, fanden, dass diese auf der Anwesenheit von Rohfaser beruht. Das tägliche Mindestmass zur Gewährleistung »zufriedenstellender« Darmfunktion beziffern sie auf 90—100 mg Faser pro kg Körpergewicht.

Die grosse Menge von Ballaststoffen in der Weizenkleie vermehrt die Stuhlmenge und verursacht eine gesteigerte Absonderung von Darmsäften. Dies hat einen erhöhten Stickstoffverlust mit den Fäkalien zur Folge.

Die Zellulosewände der Kleiezellen schliessen die im Protoplasma enthaltenen Stoffe ein. Da es nicht möglich ist, die Kleiezellen in höherem Grade zu zerkleinern (RUBNER 1925, STRASBURGER 1927), hat sich die Frage erhoben, inwieweit die Verdauungsenzyme die Zellulosemembran der Kleiezelle zu durchdringen und u. a. die Eiweissstoffe abzubauen vermögen, so dass diese dialysabel werden. In einem in vitro-Versuch von 1883 zeigt RUBNER, dass nach 17- und 34-stündiger Verdauung mit Pepsin-Salzsäure bei 38—40° ein grosser Teil der Stickstoffprodukte aus den Kleiezellen herausgelöst ist. Als RUBNER indessen 1915 bei einem Versuch am Hunde nach der Darmpassage ebenso viel Stickstoffprodukte in der Kleie wiederfindet wie vorher, stellt er

geführt (siehe hierüber S. 68). Mit anderer und sicherer Versuchstechnik habe ich gezeigt, dass die Malonsäure in etwa demselben Grade die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäurehydrierung hemmt (Kapitel III, S. 76). Szent-Györgyis Erklärung ist somit unzutreffend. OPPENHEIMER (1939, S. 1284) weist darauf hin, dass sie auch rein theoretisch unwahrscheinlich sei.

Bei der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch die Malonsäure müsste nach der  $C_4$ -Säurentheorie diese Hemmung in etwa gleichem Grade von Bs und Fumarsäure beeinflusst werden können. Bekanntlich aber *wird diese Malonathemmung durch Fumarsäure aufgehoben, hingegen nicht durch Bs*. Die Ergebnisse bei Malonathemmung lassen sich also nicht mit Hilfe der  $C_4$ -Säurentheorie erklären, wie auch mehrere Forscher dargelegt haben (OPPENHEIMER 1939, KREBS u. JOHNSON 1937, KREBS u. EGGELSTON 1940, POTTER 1940).

Können die vorliegenden Versuchsergebnisse zur Erklärung dieser Erscheinungen beitragen?

*Fumarsäurehydrierung:* Diese Reaktion wird durch Malonsäure stark gehemmt (eigene Versuche, Kap. III, S. 76). Wird Muskelextrakt mit Fumarsäure versetzt, so wird anaerob Bs gebildet. *Diese Bs-Bildung aus Fumarsäure wird durch Malonat stark gehemmt* (GREVILLE 1937).

*Aerobe Bs-Bildung bei Malonathemmung:* Wird zerkleinerte Muskulatur mit Fumarsäure allein versetzt, so wird aerob keine Bs gebildet. Nach der  $C_4$ -Säurentheorie liegt dies daran, dass die bei Hydrierung der Fumarsäure gebildete Bs schnell wieder dehydriert wird, wobei der Wasserstoff über das Cytochromsystem auf Sauerstoff übertragen wird. Die maximale Bs-Bildung des Enzympräparats müsste sich demnach anaerob nach Zusatz von Fumarsäure zeigen. Hier ist ja infolge des fehlenden Sauerstoffs die Umsetzung (Dehydrierung) der Bs verhindert. Aber *aerob bildet sich nach Zusatz von Fumarsäure und Malonsäure sogar mehr Bs als anaerob nach Zusatz von Fumarsäure allein* (GREVILLE 1937). — Nach dem oben Gesagten wird die Bs-Bildung aus Fumarsäure stark durch Malonsäure gehemmt. Die aerob gebildete Bs bei Malonat- und Fumaratzusatz (etwa 10mal grösser als unter entsprechenden Versuchsbedingungen anaerob) ist deshalb sehr wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil aus Fumarsäure gebildet worden. *Der grössere Teil der Bs ist also aus einem anderen Stoff als Fumarsäure entstanden.*

*Der Sauerstoffverbrauch bei Zusatz von Malonat:* Der Sauerstoffverbrauch ist bei Zusatz von Fumarsäure allein zu Muskulatur *in vitro* ebenso gross wie bei Zusatz von Malonsäure + Fumarsäure. Nach der  $C_4$ -Säurentheorie beruht der Sauerstoffverbrauch darauf, dass der Wasserstoff bei der Dehydrierung der Bs (über das Cytochromsystem) auf Sauerstoff übertragen wird. Nun wird aber sowohl die Bs-Dehydrierung als die Bs-Bildung

stand eingehenderer Forschung gemacht worden. FRUMIN (1938) hat jedoch an zehn Versuchspersonen den Nährwert des Weizens bei verschiedenem Ausmahlungsgrad untersucht. Er findet, dass Calcium am besten bei einem Brot aus Weizenmehl mit einem Ausmahlungsgrad von 75 % ausgenützt wird, während Phosphor am besten bei einer Ausmahlung von nur 30 % ausgenützt wird. Eine positive Magnesiumbilanz ergab sich nur bei Brot aus grobem Mehl (96 % Ausmahlung).

RUBNER (1917) macht eine Zusammenstellung über die Ausnützung der Asche in Weizen (Tab. 10) und zieht den Schluss, dass die Zufuhr nur den Verlust durch die Faeces decke und die Ausscheidung mit dem Harn völlig unkompensiert lasse.

TABELLE 10.

Ausmahlungs- grad etwa	Tägl. Brot- ration (g)	NaCl-freie Asche in d. Nahrung (g)	Asche in den Faeces (g)
30 %	934	2,95	2,95
30 %	898	2,39	2,39
70 %	882	2,85	3,90
80 %	637	6,60	7,06
94 %	989	8,54	8,34

JOHANSSON (1917) findet, dass in Versuchen an Menschen mit den Faeces eine Aschenmenge ausgeschieden wird, die 85 % der mit der Weizenkleie zugeführten Asche entspricht. PLAGGE und LEBBIN (1897) zeigen in ihren schon erwähnten Versuchen, dass die entsprechende Zahl für Roggenkleie 73,38 % ist. Nach RUBNER (1925) liefert das Brot im allgemeinen den halben Magnesiumbedarf des Menschen, jedoch nur etwa  $\frac{1}{5}$  des Calciumbedarfs. Die grosse Menge Magnesium ist jedoch nicht notwendig, und aus einem guten Trinkwasser kann doppelt so viel Calcium aufgenommen werden wie aus Vollkornbrot.

Die Bedeutung der Ballaststoffe für die Ausnützung von Salzen im Darmkanal ist unstritten. ASCHAM (1930—1931) stellt die einschlägigen Angaben der früheren Literatur zusammen und weist darauf hin, dass die Resultate einander widersprechen. Seine eigenen Versuche an Hunden deuten an, dass der Calciumverlust in den Faeces mit der Kotmenge zunimmt. BLOOM (1930) findet bei Ratten keinen erhöhten Calciumverlust bei einem Vergleich von zweierlei Kost, eine mit 0,3 %, die andere mit 8,4 % Faser, obwohl die Kotmenge bei der letzteren etwa das Dreifache gegenüber der ersteren beträgt. Auch ADOLPH, WANG und



erst wahrscheinlich eine oxydative Umsetzung zugesetzter Fumarsäure. Die unmittelbare Vorstufe der hierbei gebildeten Bs ist nicht Fumarsäure.

ad 5. Szent-Györgyi ist der Ansicht, dass bei Versuchen in vitro praktisch alle zugesetzte Oxalessigsäure zu Apfelsäure reduziert werde und dass die Dekarboxylierung von Oxalessigsäure zu Brenztraubensäure normal von untergeordneter Bedeutung sei. Die letztere Reaktion diene nur dazu, bei Bedarf Überschüsse an  $C_4$ -Säuren zu entfernen, falls das Gewebe bereits eine für die  $C_4$ -Säurenkatalyse ausreichende Menge solcher Säuren enthalte (BANGA u. SZENT-GYÖRGYI 1937). Die Oxalessigsäure wird also zu Apfelsäure reduziert, die durch Fumarase mit einer gewissen Menge Fumarsäure im Gleichgewicht steht. Bei der Beurteilung dieser Versuche muss ich wiederum auf die Unsicherheit der für die Bestimmung von Fumarsäure und Apfelsäure angewandten Methoden hinweisen. — Aber auch mit der von Szent-Györgyi angewandten Methodik lässt sich feststellen, dass zugesetzte Oxalessigsäure in vitro auf andere Weise umgesetzt wird als durch Reduktion zu Apfelsäure. BREUSCH (1939) hat in vitro verschiedene Gewebe mit einer bekannten Menge Oxalessigsäure versetzt. Durch Analyse zahlreicher organischer Säuren (Citronensäure, Fumarsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure, Brenztraubensäure, Milchsäure) hat er unter Verwendung von Szent-Györgyis Methodik untersucht, ob der verschwundenen Oxalessigsäure die Summe der gebildeten anderen Säuren entspreche oder ob in dieser „Bilanzuntersuchung“ ein Mangel entstehe. Ein solches Defizit würde andeuten, dass bei der Elimination der Oxalessigsäure ein anderer Metabolit gebildet worden ist. In Niere, Pankreas, Lunge, Milz, Placenta und peripheren Nerven entspricht die Menge der verschwundenen Oxalessigsäure der Menge der gebildeten anderen Säuren, die sich grösstenteils aus Fumarsäure und Apfelsäure zusammensetzt. Bei Versuchen mit Hirngewebe findet man nur 20 % der eliminierten Oxalessigsäure als eine oder einige der analysierten Säuren wieder, also ein Defizit von 80 %. In Leber ergibt sich ein Defizit von 50 %, in Muskel von 30 %. Dies zeigt, dass unter gewissen Versuchsbedingungen in diesen drei Geweben in vitro ein grosser Teil der zugesetzten Oxalessigsäure anders umgesetzt werden kann als durch Reduktion zu Apfelsäure. Ein Mangel an Breuschs Versuchen ist, dass er nicht auch Bs und  $\alpha$ -Ketoglutar säure analysiert hat. Nach Szent-Györgyis Theorie

die Verdaulichkeit der Bestandteile des Weizens ausübt. Die Temperatur, der ein Brot im Backofen ausgesetzt wird, ist verschieden, dürfte aber, was das Weizenbrot betrifft, im allgemeinen zwischen 250° und 270° liegen. Diese Temperatur erreicht das Brot jedoch nicht. Nur die Kruste wird auf 150—180° erhitzt (MAURIZIO, 1924), während die Krume eine Temperatur von 96—99° erreicht (ZIEGELMAYER, 1933). Auch die Backzeit wechselt sehr. Kleine Brote sind nach 15—20 Minuten fertig, während grössere Brote etwa eine Stunde benötigen. Bei grösseren Broten macht die Kruste einen kleineren Anteil des ganzen Brotes aus als bei kleineren. MAURIZIO (1924) beziffert die Menge der Kruste auf zwischen 22,5 und 44,7 % des Trockengewichtes des Brotes. Bei einem Brot von etwa 2 kg Gewicht macht die Kruste 20—25 % des Brotes aus, während bei Brötchen von 30—50 g 35—42 % auf die Kruste entfallen (TÄUFEL, 1938).

Untersuchungen über den Einfluss der Hitze auf die Verdaulichkeit und den biologischen Wert von Cerealien sind besonders von BOAS-FIXSEN, MORGAN und Mitarbeitern ausgeführt worden. So zeigten BOAS-FIXSEN und ihre Mitarbeiter 1934 durch Wachstumsversuche an Ratten, dass der biologische Wert von Vollweizen sich durch einstündiges Kochen mit 40—60 % Wasser nicht ändert. Dieser Befund bestätigt das, was MORGAN schon 1926 und 1931 für Weizenmehl festgestellt hatte. Sie fand dagegen eine Einschränkung des biologischen Wertes des Weizenmehls, wenn dieses 45 Minuten lang auf 150° erhitzt wurde. Diese Verschlechterung des biologischen Wertes war bei Vollweizen besonders stark. Dass der biologische Wert der Brotkruste unter dem der Krume von Weizenbrot liegt, zeigten Wachstumsversuche an Ratten (MORGAN und KING, 1926). Zu demselben Ergebnis kamen KON und MARKUZE (1931) in bezug auf Roggenbrot aus Mehl von 70 % Ausmahlung. Die Brotkruste wird ausserdem bei in vitro-Versuchen langsamer von Trypsin verdaut, als die Krume (GREAVES und MORGAN, 1934). Auch Kasein, das 30 Minuten lang auf 140° erhitzt wird, büsst an biologischem Wert ein. Indem sie diesem Kasein verschiedene Aminosäuren zusetzten, glauben GREAVES und MORGAN (1933—1934) gezeigt zu haben, dass es vor allem das Lysin und das Histidin sind, die bei der Erhitzung zerstört werden, was die Einbusse an biologischem Wert verursachen soll. Bei Wachstumsversuchen an Ratten mit Weizenzwiebäcken und Brot aus demselben Teich stellte ABELIN (1930) fest, dass die Ratten bei Fütterung mit

ihrer Wirksamkeit die Anwesenheit von Codehydrase I (Cozymase). Sowohl bei Reduktion von Oxalessigsäure als bei Dehydrierung von Apfelsäure wird der verfügbare Wasserstoff auf Codehydrase I übertragen, die dabei in ihre reduzierte Form übergeht. Bei der  $C_4$ -Säurenkatalyse wird also diese Form zweimal gebildet, erst bei der Reduktion von Oxalessigsäure bei der Triosephosphatdehydrierung und dann bei der Apfelsäuredehydrierung. Es ist daher nach Martius wenig wahrscheinlich, dass die Oxalessigsäure-Apfelsäure-Katalyse ein für den Wasserstofftransport notwendiges Glied darstellt.

Dies sind in Kürze die wichtigsten kritischen Gesichtspunkte, die sich gegen Szent-Györgyis Untersuchungen und die daraus abgeleiteten Theorien anführen lassen. Wir schliessen daraus: *Szent-Györgyis Ansicht über die dominierende Bedeutung der  $C_4$ -Säuren für den Wasserstofftransport kann gegenwärtig nicht anerkannt werden.*

Sowohl Oxalessigsäure als Fumarsäure können als Wasserstoffacceptoren für reduzierte Codehydrogenase I dienen und können also auch als Katalysatoren beim Wasserstofftransport im Sinne Szent-Györgyis wirken. Dies ist keine spezifische Eigenschaft der  $C_4$ -Säuren. So können z. B. Fumarsäure, Oxalessigsäure, Brenztraubensäure, Acetessigsäure oder Acetaldehyd als Wasserstoffacceptor für reduzierte Codehydrogenase I bei der enzymatischen Oxydation von  $\beta$ -Oxybuttersäure *in vitro* dienen (DEWAN u. GREEN 1937). KNOOP (1938) hebt hervor, dass Metaboliten beim Abbau der Aminosäuren als Wasserstoffacceptoren *in vitro* wirken können. Sie treten dabei als Katalysatoren auf und schwingen zwischen oxydierten und reduzierten Formen. OPPENHEIMER (1939, S. 1013) ist der Ansicht, dass „vorübergehend während einer gewissen Gleichgewichtslage — z. B. bedingt durch ein bestimmtes Redox-Potential — nimmehr eine *Stoffwechselabbaustufe als Katalysator* fungieren kann, indem sie als reversibles Redoxsystem eine Zeitlang andere Stufen dehydriert und den Wasserstoff weitergibt, bis die Bedingungen andere werden, und diese Stufe von der Rolle eines Katalysators herübergewechselt zu der eines Metaboliten, der selbst in den Abbau hineingezogen wird.“

Nachdem in der obigen Kritik die meisten Argumente Szent-Györgyis für die  $C_4$ -Säurentheorie widerlegt worden sind, dürfte von diesen nur die Tatsache übrig sein, die Szent-Györgyi ursprünglich die Grundlage seiner Theorie bilden liess: dass

nach innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik. Vorsichtiger sind LUNDE, KRINGSTAD und OLSEN (1939) in ihren Schlussfolgerungen. Sie halten es für schwierig, mit Sicherheit zu berechnen, ob während des Backens ein Verlust an Vitamin B<sub>1</sub> eintritt. Jedenfalls halten sie diesen etwaigen Verlust für nicht besonders gross.

Beim Backen bilden sich in der Brotkruste Röstprodukte. Solche Stoffe bezeichnen BICKEL und Mitarbeiter (1921, 1927, 1928) als »Hitzesekretine«. Diese steigern die Magensaftsekretion und die Darmperistaltik. KESTNER (1922) hat ebenfalls nachgewiesen, dass die Röstprodukte in der Brotkruste die Magensaftsekretion anregen. Die Kruste von Brot und geröstete Brotscheiben sollen länger im Magen verbleiben als Brotkrume und ungeröstete Scheiben. Durch die verstärkte Absonderung von Magensaft findet im Darmkanal eine bessere Ausnützung sowohl der Stickstoffprodukte als der totalen Brotmenge bei Genuss von Brot mit verhältnismässig viel Kruste im Vergleich zu Brot mit wenig Kruste statt (KESTNER und KNIPPING, 1926). Man würde also mit anderen Worten bei einer gegebenen Teigmenge eine bessere Ausnützung erzielen, wenn man daraus kleine Brote backt statt grosser. Die Versuche, auf die KESTNER (1922) diese seine Behauptungen gründet, sind teils mit Brot aus 94 % Roggenmehl und teils mit solehem aus 85 % Weizenmehl ausgeführt. Er findet in diesen Versuchen, dass die mit den Faeces ausgeschiedene Menge Trockensubstanz beim Genuss von Weizenbrot kleiner ist, wenn dieses in Form kleiner Brote verzehrt wird, als beim Genuss grosser Weizenbrote, während hingegen die kleinen Roggenbrote geringeren Stickstoffverlust durch die Faeces bewirken als die grösseren. Die Versuche, im ganzen sieben, sind an zwei Menschen ausgeführt, und zwar vier mit Weizenbrot und drei mit Roggenbrot. Der Stickstoffverlust mit den Faeces war bei der Roggenbrotkost 61,1, 49,0 und 57,5 % bei grossen Roggenbroten bzw. »Rundstücken« und Brötchen. Die mit der Kost bei den verschiedenen Versuchen zugeführte Stickstoff- und Gesamtbrotmenge war nicht konstant. Da bei den verschiedenen Brotsorten kein grösserer Unterschied zwischen den Stickstoffverlusten mit den Faeces festgestellt worden ist, dürfte eine Nachprüfung erforderlich sein, bevor man weiterreichende Schlüsse aus diesen Resultaten zieht.

---

säure auf Succinodehydrogenaselösungen näher erforscht werden. Die betreffenden Versuche werden in Kap. III beschrieben.

Es sind für die Versuchstiere geeignete Dosen zu erproben. Soweit dies noch nicht bekannt ist, gilt es festzustellen, dass bei den später verwendeten Dosierungen keine pharmakologischen Wirkungen auftreten, die möglicherweise sekundär Störungen des Stoffwechsels verursachen könnten. Diese Versuche werden in Kap. IV beschrieben.

Nach diesen Vorarbeiten können die endgültigen Umsetzungsversuche am ganzen Tier und bei Organperfusion ausgeführt werden. Planung, Ausführung und Ergebnisse derselben werden in Kap. V behandelt.

---

bekannt, doch bestehe kein Anlass anzunehmen, dass die Magnesiummenge der Nahrung zu klein sei.

Die »Norrlandsundersökningen« wurde am Ende einer Hochkonjunktur durchgeführt, und ABRAMSONS Untersuchung stammt aus einer Zeit, als die Arbeitslosigkeit in Schweden recht gross war. Doch dürfte man sagen können, dass zur Zeit beider Untersuchungen im Vergleich zur jetzigen Lage relativ gute Bedingungen für eine gute Volksernährung bestanden. Sie zeigen auch, dass der Mangel an den hier in Rede stehenden Stoffen, vom Vitamin B abgesehen, sehr klein war. Wenn man unter den jetzigen Verhältnissen die Möglichkeit untersucht, das Mehl ergiebiger zu machen, so muss es von Interesse sein klarzustellen, wie die Kleie im menschlichen Darmkanal ausgenützt wird. Da Kleie, wenn man von gewissen Lebensreformern absieht, hauptsächlich in Form von Vollkornbrot verzehrt werden würde, hat sich meine Untersuchung vor allem das Ziel gesetzt, den Einfluss der Hitze auf die Verwertbarkeit der Kleie klarzulegen. Hierbei ist ein Vergleich vorgenommen worden zwischen nicht erhitzter Weizenkleie und solcher Weizenkleie, die auf Temperaturen erhitzt worden ist, wie sie denen entsprechen, die beim Backen in der Krume und der Kruste eines Brotes erreicht werden.

## Zielsetzung.

Die vorliegende Untersuchung will die Einsicht betreffend den nahrungsphysiologischen Wert der Weizenkleie erweitern. Sie soll dazu beitragen, die umstrittene Frage nach der Bedeutung des groben Brotes klarzulegen.

Vom nahrungsphysiologischen Gesichtspunkt aus hat die Kleie sowohl gute als schlechte Eigenschaften. Durch die Weizenkleie werden der Kost u. a. hochwertige Eiweissstoffe, B-Vitamine und mineralische Stoffe zugeführt. Die Zellulose der Kleie kann sowohl einen günstigen als einen ungünstigen Einfluss im Darmkanal ausüben, je nach der Menge, in der sie verzehrt wird.

Zu den vom nahrungsphysiologischen Gesichtspunkt aus schlechteren Eigenschaften der Kleie ist vor allem der reizende Einfluss der Zellulose auf den Darmkanal bei Zufuhr grosser Kleiemengen zu zählen. Kleie in grossen Mengen bewirkt eine lebhaftere Peristaltik, eine schnellere Darmpassage mit wahr-

zur Anwendung gebracht worden. In der Mehrzahl der Fälle hat man sich die Löslichkeitsverhältnisse der Bs und gewisser Succinate zunutze gemacht. Bs ist in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich und lässt sich mit Leichtigkeit aus saurer wässriger Lösung mit Äthyläther extrahieren. Ätherextraktion von Bs in dieser Weise ist ein Glied der meisten Analysemethoden. Was die Löslichkeit der Succinate angeht, so ist in diesem Zusammenhang folgendes von Interesse<sup>1</sup>: Calcium- und Bariumsuccinat ist in Wasser löslich bzw. ziemlich löslich, beide aber sind sehr schwerlöslich in 70—80 %-igem Alkohol. Das Silbersuccinat ist in wässriger Lösung äusserst schwerlöslich. Bs kann aus nicht allzu schwachen Lösungen durch Zusatz von Ferrichlorid quantitativ als basisches Ferrisuccinat gefällt werden. Bleisuccinat ist in Wasser schwerlöslich. Viele Analysemethoden fassen auf dem Ausfällen von Bs in Form eines dieser schwerlöslichen Succinate, bisweilen mit Extraktion von Bs mit Äther oder Alkohol kombiniert. Die endgültige Bestimmung erfolgte dann in der Regel gravimetrisch. (ALBAHARY 1907; ASLANOGLU 1896; BORDAS u. a. 1888; GREY 1908; HARDEN 1901; JÖRGENSEN 1907; KAYSER 1882; KEIM 1891; LABORDE 1918; MACAGNO 1875; MÜLLER 1896; MUSSET 1885; PASTEUR 1864; RAE 1893; SCHMITT u. HEPE 1882.)

Die Bs allein durch Extraktion und Ausfällen von den übrigen organischen Säuren, die in biologischem Analysengut vorkommen können, zu scheiden, ist sehr schwer. Es bedeutete deshalb einen grossen Schritt vorwärts, als man entdeckte, dass man sich die grosse Widerstandskraft der Säure gegen starke Oxydationsmittel für ihre Bestimmung zunutze machen kann (KUNZ 1903). Es wurden dann zahlreiche Methoden ausgearbeitet, die teils Kaliumpermanganat oder Dichromat-Schwefelsäure verwenden, um störende organische Stoffe zu verbrennen, teils gleichzeitig das Fällungs- und Extraktionsverfahren wie oben heranziehen. (BONIFAZI 1929; BOTTINI 1938; GLIMM u. NITSCHKE 1932; HEIDE u. STEINER 1909; HEIDESCHKA u. QUINCKE 1907; MESTREZAT 1906; NUCCONI u. ZACCAGNINI 1932; POZZI-ESCOT 1908; SÉMICHON u. FLANZY 1932.)

Die obigen Methoden sind in der Regel für die Analyse von Wein oder Obststäben bestimmt. Einige auf den obengenannten Prinzipien fussende Methoden sind besonders für die Bestimmung von Bs in tierischem Material (Gewebe, Plasma u. dgl.) ausgearbeitet. Die zuverlässigsten von diesen haben MOYLE (1924) und MASSART u. GUENEBEUGEN (1938) veröffentlicht. MOYLES Methode erfordert verhältnismässig grosse Mengen Analysenmaterial. M. findet mit seiner Methodik von 4—5 mg Bs, die er der Muskulatur zusetzt, 95 %  $\pm$  5 % wieder. Die beiden letzteren Forscher arbeiten mit kleineren Mengen Ausgangsmaterial und können 0.1—0.6 mg Bs in Muskelgewebe mit einem Fehler von etwa  $\pm$  10 % bestimmen. Diese beiden Methoden sind nicht ganz spezifisch. Ihre Genauigkeit reicht für unsern Zweck nicht aus, und die Menge des für eine Analyse benötigten Ausgangsmaterials ist allzu gross.

<sup>1</sup> Eine Übersicht über die Löslichkeit verschiedener Succinate findet sich bei RAE (1893).

## EXPERIMENTELLES.

### Kap. I.

## Verdauungsversuche in vitro.

Die Verdauungsversuche in vitro wurden vorgenommen, um eine relative Vorstellung darüber zu gewinnen, wie viel Eiweiss, Calcium und Magnesium aus Weizenkleie herausgelöst werden kann. Zu den Versuchen wurde Handelskleie ungeschälten Weizens, der auf 80 % ausgemahlen war, verwendet. Diese Weizenkleie enthält Schalenteile, die Aleuronschicht und Keimlinge. Ihre Zusammensetzung, an der an der Luft getrockneten Substanz berechnet, ist aus Tabelle 11 ersichtlich.

TABELLE 11.

Weizenkleie (80—100 % Ausmahlung)

	%
Trockensubstanz	89,90
Stickstoff	2,862
Calcium	0,082
Magnesium	0,489
Fett	3,88
Rohfaser	10,8

Vor den Verdauungsversuchen wird die Kleie in einer Handmühle so vermahlen, dass 55—60 % der Kleie ein Sieb mit 0,3 mm Fadenabstand und 100 % ein Sieb mit 1 mm Fadenabstand passieren.

Falls nichts anderes bemerkt, sind die Verdauungsversuche in vitro in Spezialgläsern von 100 ml Volumen ausgeführt worden. Die Gläser sind so vorbehandelt, dass sie kein Alkali abgeben. Eine abgewogene Menge Weizenkleie wird in die Verdauungsgefäße gebracht, mit einer bekannten Menge Verdauungs-



stimmt wird. Diese Methode ist auch nicht genügend empfindlich. SZENT-GYÖRGYI hat in seinem Institut eine Methode ansarbeiten lassen (GÖZSY, 1935), die sich auf die Fähigkeit gewaschener Muskulatur stützt, nach Zusatz von Bernsteinsäure Sauerstoff zu verbrauchen, wobei der Verbrauch in direktem Verhältnis zur Succinatmenge steht. Der Sauerstoffverbrauch wird nach Warburg gemessen. Die kleinste Menge Bernsteinsäure, die Szent-Györgyi auf diese Weise analysieren konnte, war 0,2 mg (200  $\gamma$ ) mit einem Fehler von 50 %. Der absolute Fehler war also 100  $\gamma$ . Diese Methode ist von KREBS und von WEIL-MALHERBE technisch verbessert worden. Der erstere hat als kleinste Menge in einem einzelnen veröffentlichten Versuch 250  $\gamma$  mit einem Fehler von 1 % bestimmt, der letztgenannte Autor entsprechend 600  $\gamma$ . In keinem dieser Fälle ist der Versuch gemacht worden, den mittleren Fehler der Methode festzustellen. In Anbetracht der Methodik für die Messung des Sauerstoffverbrauchs kann man den absoluten Fehler in beiden Fällen auf mindestens 20  $\gamma$  schätzen.

Wir können also zusammenfassend feststellen, dass von den Methoden zur Bestimmung von Bernsteinsäure nur die von Thunberg angegebene eine ausreichende Genauigkeit ermöglicht, dass diese Methode jedoch wegen ihrer Umständlichkeit für die Analyse grösserer Probenreihen, was bei Stoffwechselversuchen notwendig sein kann, nicht geeignet ist.

### Das Prinzip der neuen Methode.

Es ist von vornherein unwahrscheinlich, dass sich bei diesen niedrigen Bs-Konzentrationen eine Bestimmungsmethode auf das Ausfällen von Bs in Form eines schwerlöslichen Succinats gründen könnte. Eine Voruntersuchung über die Löslichkeit der bisher für die Bs-Analyse benutzten Succinate (Ca- und Ba-Succinat in Alkohol, Silber- und Bleisuccinat, bas. Ferrisuccinat) zeigte auch, dass keines von ihnen so schwerlöslich ist, dass es für die Bs-Bestimmung bei den Konzentrationen, um die es sich hier handelt, brauchbar wäre. Neubergs Pyrolreaktion ist, wie schon gesagt, wegen ihrer geringen Spezifität nicht geeignet. Es bleibt also nur die Möglichkeit, eine neue biologische Methode auszuarbeiten oder eine der oben angegebenen umzuarbeiten.

Nachdem ich mehrere verschiedene Prinzipien geprüft hatte, fand ich das von J. LEHMANN (1938) zur Bestimmung von Milchsäure angewandte am besten. Die in der Probe befindliche Menge Bernsteinsäure wird hier von Succinodehydrogenase zu Fumarsäure dehydriert, mit Ferricyanid als Wasserstoff-acceptor. Für jedes Molekül dehydrierte Bernsteinsäure bilden sich 2 Moleküle Ferrocyanid. Nach beendeter Reaktion wird

- 1) nicht wärmebehandelter Weizenkleie (= unbeh. K.),
  - 2) während 1 Stunde auf 97° erhitzter Weizenkleie (= K. 97°),
  - 3) während 1 Stunde auf 170° erhitzter Weizenkleie (= K. 170°).
- Verdauungszeit: 2, 3 und 4 Stunden.

Tabelle 12 zeigt die ausgelöste N-Menge in Prozent des N-Gehaltes der verwendeten Kleie. Als Verdauungsflüssigkeiten haben gedient 1. Salzsäure (pH 1,7), 2. destilliertes Wasser (pH 6) und 3. eine 3%ige Lösung von Natriumbicarbonat in destilliertem Wasser (pH 8,1).

TABELLE 12.

Verdauungszeit	Ausgelöste N-Menge in % d. ursprüngl. Menge		
	unbeh. K.	K. 97°	K. 170°
Auslösungsflüssigkeit: Salzsäure, pH 1,7			
2 Stdn.	28	26	11
3 „	27	26	11
4 „	27	25	11
Auslösungsflüssigkeit: Dest. Wasser, pH 6			
2 Stdn.	31	23	10
3 „	29	24	11
4 „	30	24	13
Auslösungsflüssigkeit: Natriumbicarbonatlösung, pH 8,1			
2 Stdn.	35	27	6
3 „	39	28	6
4 „	44	30	6

Alle diese Flüssigkeiten lösen eine kleinere Menge N-Produkte aus K. 170° als aus unbeh. K. aus. Auch eine Erhitzung auf 97° scheint die Auslösbarkeit des Stickstoffs ein wenig herabzusetzen. Der letztgenannte Unterschied dürfte jedoch bei den Versuchen mit Salzsäure so klein sein, dass er innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik liegt. Dagegen ist der Unterschied bei Auslösung mit destilliertem Wasser etwas grösser und bei Verdauung mit Natriumbicarbonatlösung am grössten.

Ausser den Versuchen mit Salzsäure, destilliertem Wasser und Bicarbonatlösung allein sind Verdauungsversuche mit Pepsin und Trypsin ausgeführt worden. Die verwendeten Präparate waren das Pepsin der schwedischen Pharmakopoe und ein Trypsin der Firma Merck. Von den Enzympräparaten wurde so viel zugesetzt, dass das Verdauungsgemisch 1‰ davon enthielt.

wurde nun ein Redoxindikator zugesetzt, dessen Potential zwischen dem des Ferricyanid- und dem des Succinat-Systems liegt. Nach Prüfung mehrerer Indikatoren stellte es sich heraus, dass 2 : 6-Dichlorophenolindophenol richtige Resultate ergibt, auch da, wo man ohne Farbzusatz zum Ferricyanid falsche Werte für bekannte Succinatmengen erhielt.

Wie spätere Untersuchungen gezeigt haben, ist indessen die theoretische Grundlage der Farbwirkung nicht ganz die oben beschriebene. Sie ist bisher noch nicht völlig klargestellt und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Seit langem ist es bekannt, dass Succinodehydrogenaselösungen von der Art der bei diesen Versuchen angewandten (s. unten) bei Zusatz von Succinat Sauerstoff verbrauchen. Könnte bei Bestimmung nach dieser Methode der Sauerstoff der Luft ganz oder teilweise als Wasserstoffaceptor dienen, so wäre die Analyse natürlich wertlos. Ein Arbeiten im evakuierten System, wie bei Thionin- oder Methylenblau-Versuchen, würde das Verfahren erheblich komplizieren. Deshalb wurden die ersten Versuche statt dessen mit einem Zusatz von Cyanid in einer Konzentration ausgeführt, bei der die Cytochromoxydase und damit der Sauerstoffverbrauch vollständig gehemmt wurde. Es zeigte sich jedoch, dass bei Vorhandensein von Ferricyanid im *Überschuss* ohne Cyanid-Zusatz kein Sauerstoff verbraucht, sondern der Wasserstoff quantitativ auf das Ferricyanid übertragen wurde. Dies lag jedoch nicht an einer Hemmung der Cytochromoxydase, denn setzt man statt dessen Succinat im Überschuss zu, also mehr als der anwesenden Menge Ferricyanid entspricht, so findet ein Sauerstoffverbrauch statt.

Der Sauerstoff der Luft stört also, bei Vorhandensein von Ferricyanid im Überschuss, die Reaktion nicht.

### Reagenzien und Lösungen.

*Kaliumferricyanidlösung:* 0,05-molare *Stammlösung*. 3,292 g Kaliumferricyanid (Kahlbaum zur Analyse) wird mit Aqua redest. auf 200 ml verdünnt.

*Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung:* 20 ml Kaliumferricyanid-Stammlösung + 10 ml 2 : 6-Dichlorophenolindophenollösung 1 : 2000 werden mit M/15 Sörensen-Phosphat pH 7,38 auf 100 ml verdünnt.

*Farblösung:* 2 : 6-Dichlorophenolindophenol 0,020 g werden in 100 ml Aqua redest. gelöst. Die Lösung muss 24 Stunden in Zimmertemperatur stehen, bevor sie filtriert und gebraucht wird. An dunkler Stelle aufzubewahren.

*M/15 Phosphat pH 7,38:* 9,501 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 21\text{H}_2\text{O}$  (Merck, nach Sörensen) und 1,816 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, nach Sörensen), Aqua redest. ad. 1 l.

*Mohrs Lösung:* 0,02-molare *Stammlösung*. 0,7844 Mohrs Salz (Merck, Ferro-Ammonium sulfuricum pro Analysisi +  $6\text{H}_2\text{O}$ ) + 5 ml 18-n Schwefel-

findet man, dass in den Versuchen mit zugesetztem Enzym mehr N ausgelöst worden ist. Pepsin und Trypsin vermögen also die Menge des auslösbaren N zu steigern. Sie können mit anderen Worten die N-Produkte der Kleiezellen abbauen; *die Enzyme können die Wände der Kleiezellen durchdringen.*

Der folgende Versuch wurde gemacht, um zu kontrollieren, dass die proteolytischen Enzyme der Kleie durch einstündiges Erhitzen auf  $97^{\circ}$  zerstört werden. Der Versuch stützt sich auf den von JÖRGENSEN (1935) geführten Nachweis, dass die Proteinasen des Weizenmehls durch Glutathion aktiviert werden können. Es sollte damit also untersucht werden,

1) ob auch die Kleieproteinasen durch Glutathion aktiviert werden (Versuch mit unbeh. K.),

2) ob eine solche Aktivierung auch noch nach einstündiger Erhitzung der Kleie auf  $97^{\circ}$  möglich ist (Versuch mit K.  $97^{\circ}$ ).

Von unbeh. K. und K.  $97^{\circ}$  wurden je 6mal 1 g abgewogen und in Zentrifugenröhren von 25 ml Volumen gefüllt. Doppelproben jeder Kleiesorte wurden versetzt mit

a) 15 ml Salzsäure, pH 1,7,

b) 15 ml dest. Wasser, pH ca. 6,

c) 15 ml 3% Natriumbicarbonatlösung, pH 8,1.

Die eine von jeder Doppelprobe wurde mit 1 ml Glutathionlösung, 2 mg Glutathion (Hoffmann-La Roche) enthaltend, versetzt, die andere mit 1 ml dest. Wasser. Nachdem in jede Probe 4 Tropfen Toluol gegeben worden waren, wurden die Röhren verstöpselt, zugebunden und 2 Stunden bei  $37^{\circ}$  im Thermostat geschaukelt. Anschliessend wurde sofort zentrifugiert, worauf von dem Bodensatz und der darüberstehenden Lösung quantitative Proben zur N-Bestimmung entnommen wurden. Von dem in der Verdauungsflüssigkeit gefundenen N wurde die bekannte Menge Glutathion-N abgezogen. Die Versuchsreihe wurde einmal wiederholt. Tabelle 14 zeigt die gefundene Unterschiede zwischen den prozentual ausgelösten N-Mengen in den Versuchen mit und ohne Glutathion.

Es war keine Aktivierung der Proteinasen in den Versuchen mit K.  $97^{\circ}$  nachzuweisen. Der Versuch bestätigt die Annahme, dass diese vollständig oder so gut wie vollständig durch einstündige Erhitzung auf  $97^{\circ}$  zerstört werden. Aus der unbehandelten Weizenkleie werden dagegen in Anwesenheit von Glutathion mehr N-Produkte ausgelöst. Bei pH 1,7 und 6 ist diese Steigerung sehr gering und dürfte sich in den Grenzen der Versuchsfehler

Phosphatlösung wird in kleinen Mengen unter ständigem Umrühren im Mörser zugesetzt. Nachdem alle Phosphatlösung zugesetzt ist, wird das Gemisch dann und wann  $\frac{1}{2}$  Stunde lang gerührt und dann 10—15 Min. energisch zentrifugiert. Die Aktivitätsprüfung und Bestimmung der Spontanreduktion wird nach J. LEHMANN (1930) im Thunberg-Versuch ausgeführt.

Zur Aktivitätsprobe wird folgendes Reaktionsgemisch verwendet:

M/15 Phosphatpuffer pH 7,3 .....	2,0 ml
M/5 Natriumsuccinat .....	0,2
Methylenblau-Lösung 1 : 2000 (150 $\gamma$ ) .....	0,3
Enzymlösung .....	0,5

Zur Bestimmung der Spontanreduktion:

M/15 Phosphatpuffer pH 7,3 .....	2,0 ml
Methylenblau-Lösung 1 : 33333 (15 $\gamma$ ) .....	0,5
Enzymlösung .....	0,5

Als Mass der Aktivität und Spontanreduktion wird die Entfärbungszeit in Minuten bei Entfärbung bei 37° angegeben.

Die Enzymlösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und hält sich in der Regel 4 Tage.

### Ausführung der Bestimmung.

Zu 1 ml der Probe werden in einer Zentrifugenröhre 1 ml Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung und 0,5 ml Enzymlösung gegeben. Die gleichen Mengen werden der Enzym-Wasser-Kontrolle zugesetzt, statt der Probe wird hier jedoch 1 ml Wasser genommen. Es empfiehlt sich, Doppelproben zu machen. Nachdem die Röhren 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln gestanden haben, setzt man 0,5 ml 30 %ige Trichloressigsäure zu. Nach 10 Min. wird die Lösung 7 Min. lang zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min.). Aus jeder Röhre werden (mit ausgewogener Pipette) 2 ml in Titrierröhren mit flachem Boden abpipettiert. (Dimension der Titriergläser; siehe LEHMANN 1938.) Jede Röhre wird mit 3 ml 18-n Schwefelsäure, 3 ml Wasser und 3 Tropfen Indikatorlösung versetzt. Dann wird mit etwa 0,001-molarer Cerisulfatlösung aus einer Mikrobürette titriert. Am besten verwendet man hierbei Druckluft zum Umrühren. Das Ablaufrohr der Cerisulfatlösung, das zu einer Kapillare ausgezogen ist, muss unterhalb des Flüssigkeitsspiegels nahe dem Boden neben der Mündung des Druckluftrohrs münden. Unter gutem Umrühren lässt man

TABELLE 15.

Verdauungszeit	Ausgelöste N-Menge in % d. ursprüngl. Menge		
	unbeh. K.	K. 97°	K. 170°
	Auslösungsflüssigkeit: Magensaft, pH 1,7		
2 Stdn.	38	39	15
3 „	39	39	16
4 „	39	40	16

TABELLE 16.

Verdauungszeit	Ausgelöste N-Menge in % d. ursprüngl. Menge		
	unbeh. K.	K. 97°	K. 170°
	Auslösungsflüssigkeit: Duodenalsaft, pH 8,0		
2 Stdn.	65	62	26
3 „	71	64	29
4 „	75	71	30

zellen heraus, als Salzsäure bzw. Natriumbicarbonatlösung mit entsprechendem pH (siehe Tab. 12). Die proteolytischen Enzyme des menschlichen Magen- und Duodenalsaftes vermögen also in die Kleiezelle einzudringen. Dies bestätigt, was schon für Pepsin und Trypsin festgestellt wurde. Ferner kann man hier eine schlechtere Auslösbarkeit der N-Produkte aus K. 170° beobachten.

In einem anderen Versuch wurden unbeh. K. und K. 170° zuerst mit Magensaft und dann mit Duodenalsaft verdaut. Der Magen- und Duodenalsaft wurden in der oben angegebenen Weise gewonnen, der Magensaft von demselben Patienten, der Duodenalsaft von einem anderen. Der pH des Magensaftes war in diesem Falle 2,5, der des Duodenalsaftes 8,5. Der Verdauungsversuch wurde in Zentrifugenröhren von 25 ml Volumen ausgeführt. Nachdem der Magensaft die Kleiezellen 3 Stunden lang verdaut hatte, wurde der Röhreninhalt zentrifugiert, die Verdauungsflüssigkeit abgegossen und der Bodensatz 2mal mit dest. Wasser gewaschen. In Verdauungsflüssigkeit und Waschwasser wurde der N bestimmt. Darauf wurde der Duodenalsaft zu den mit Magensaft verdauten Kleiezellen gegeben. Mit 1 n Salzsäure wurde der pH auf 6,5 geändert. Die Verdauungszeit war in diesem Versuch 2, 4 und 6 Stunden für je eine Probe unbeh. K. und K. 170°. Nach beendeter Verdauung wurden die Kleiezellen wieder 2mal mit dest. Wasser gewaschen. Dann wurde der N in dieser Verdauungsflüssigkeit + Waschwasser sowie in der verdauten Weizenkleie bestimmt. Das Ergebnis dieses Verdauungsversuches ist aus Tabelle 17 zu ersehen.

$$\text{Faktor: } 88,575 \cdot \frac{2}{2,037} = 88,575 \cdot 0,9818 = 86,96.$$

ml Cerisulfatlösung entsprechend der Menge der Bernsteinsäure in der Probe:

$$1,856 - 0,537 = 1,359.$$

Ergebnis der Analyse:  $86,96 \cdot 1,359 = 118,2 \gamma$  Bernsteinsäure

In der Probe anwesende Menge Bernsteinsäure: ..... 118,17

Differenz: ..... 0,17

Proz. Fehler: ..... 0,1 %

### Standardisierung der Versuchsbedingungen.

*Volumen des Reaktionsgemischs:* Die Methode ist standardisiert worden, so dass das Gesamtreaktionsvolumen 3 ml beträgt. Dadurch ist es möglich, 2 ml zum Titrieren zu verwenden, so dass der Cerisulfatverbrauch nicht zu gering und der Titrierfehler nicht relativ gross wird. Gleichzeitig wurde bis zu 1 ml der Probelösung verwendet; bei hoher Succinatkonz. wurde entweder verdünnt oder eine kleinere Menge zugesetzt, wobei das Volumen mit destilliertem Wasser auf 1 ml gebracht wurde. Es ist ein Vorteil, eine so grosse Menge Analysenmaterial zu verwenden, da die Succinatmenge z. B. des Serums normal so gering ist.

*Ferricyanidkonzentration:* Es wäre selbstverständlich von Vorteil, eine möglichst grosse Menge Ferricyanid zu verwenden. Die Bestimmung könnte dann bei höherer Bs-Konzentration als sonst ausgeführt werden. Doch ist es nicht möglich, beliebig hohe Ferricyanidkonzentrationen zu haben, da höhere Konzentrationen die Succindehydrogenase hemmen, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Jedes Röhrechen ist mit 1,0 ml 0,001-mol. Succinat versetzt  $\equiv$   $\equiv$  118,1  $\gamma$  Bs. Jeder Wert ist der Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

einen möglichst schnellen Abbruch der Verdauung zu bewirken, habe ich das Verdauungsgefäß in kaltem Wasser gekühlt und die Verdauungsflüssigkeit mit Lauge bzw. Salzsäure neutralisiert. Bei der Neutralisation lässt sich Methylorange als Indikator benutzen.

Natriumbicarbonatlösung hat in diesem Falle keine Anwendung finden können. Wenn bei der Neutralisation mit Salzsäure die Kohlensäure entweicht, bildet sich nämlich ein so starker Schaum, dass die Probe überfließt. Deshalb wurde Boratpuffer benutzt. Die Versuchsergebnisse gehen aus Tabelle 18 hervor.

TABELLE 18.

Verdauungs- zeit	Ausgelöste N-Menge in % der ursprüngl. Menge durch Verdauung mit:					
	Pepsin-Salzsäure (pH 1,7)			Trypsin-Boratpuffer (pH 8,1)		
	unbeh. K.	K. 97°	K. 170°	unbeh. K.	K. 97°	K. 170°
3 Min.	30	29	12	23	25	19
5 „	32	31	13	—	—	20
10 „	34	37	17	28	27	21
15 „	37	40	24	30	28	23
30 „	42	44	25	33	32	24
60 „	45	45	27	37	37	26
120 „	48	49	28	42	41	28

Die Werte der durch Pepsin ausgezogenen N-Menge sind im allgemeinen höher als die durch Verdauung mit Trypsin erhaltenen. Bei den hier benutzten Enzympräparaten pflegt das Verhältnis umgekehrt zu sein. Die Erklärung dürfte in den nachstehend genannten Faktoren liegen können:

a) Borat hemmt Enzyme,

b) nach der Pepsinverdauung verschiebt sich der pH-Wert bei der Neutralisation im alkalischen Sinne; die Eiweissstoffe gehen leichter in Lösung. Nach der Trypsinverdauung ist es umgekehrt.

Ein Blick auf die Versuchsergebnisse zeigt, dass bereits nach 3 Min. Verdauung ein nicht geringer Teil der N-Produkte ausgelöst ist. Um zu untersuchen, ein wie grosser Anteil der N-Auslösung auf das Konto des Enzyms zu setzen ist, sind mit K. 97° Doppelproben ausgeführt worden, und zwar exakt wie in den Verdauungsversuchen, nur ohne Enzymzusatz. Es zeigt sich, dass mit Salzsäure (pH 1,7) 12% der Stickstoffprodukte



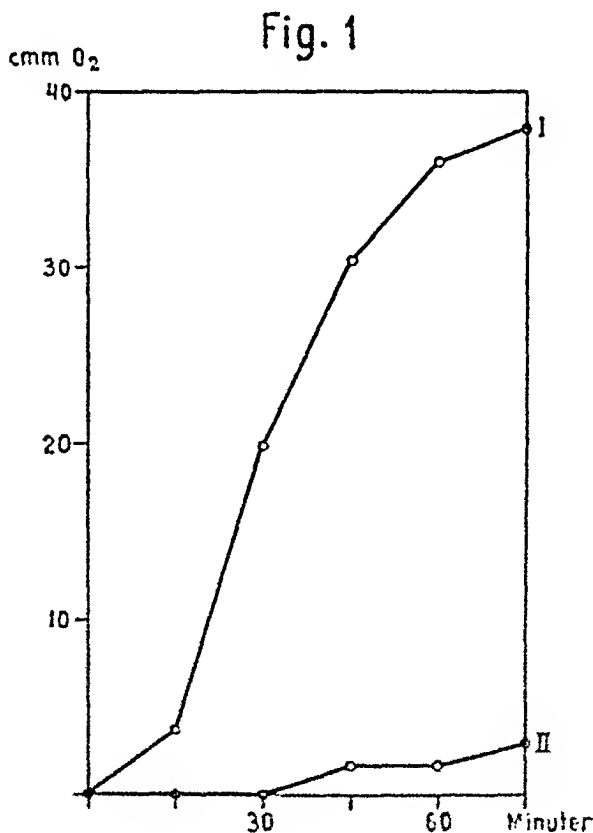
Bild 305. Zusätze in gleicher Proportion wie bei der B<sub>5</sub>-Bestimmung: 1 ml Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung (mit 0,01-m. Ferricyanid), 0,5 ml Enzymlösung, 0,2–0,3 ml Succinat im Seitenröhrchen, im Rezipienten Aqua redest. ad 2,5 ml, im „KOH-Einsatz“ 0,3 ml 5 % KOH.

Atmosphäre: Luft. Schütteln: Amplitude  $\pm 20$  mm. Frequenz 100/Min. Ableseperioden: 15 Minuten. Temperatur 37,0°.

TABELLE 2.

<i>cmm O<sub>2</sub></i> während 7 Ableseperioden (105 Min.).	<i>Zusatz im Seitenröhrchen.</i>
7,7 7,7	0,2 ml Succinat 0,02 mol.
7,9 7,4	0,2 ml aqua redest.

Die obige Tabelle zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch nach Zusatz von Succinat nicht ansteigt, wenn Ferricyanid im Überschuss anwesend ist.



1,7) und Trypsin-Natriumbicarbonatlösung (pH 8,1). Je eine der gleich lange Zeit erhitzten Proben wurde mit Pepsin und mit Trypsin verdaut. Die Verdauungszeit war 2 Stunden. Die Versuchsergebnisse sind aus Tabelle 19 ersichtlich.

Man kann also feststellen, dass Pepsin und Trypsin eine gleich grosse Menge Stickstoff aus Weizenkleie auszulösen vermögen, wenn diese 4 Stunden lang auf 97° erhitzt war, als wenn die Kleie nur eine Stunde lang dieser Temperatur ausgesetzt war.

### 5. Grad der Erhitzung und ausgelöste N-Menge.

Wie oben festgestellt, wird die Verdaulichkeit des N in Weizenkleie durch Erhitzung der Kleie auf 170° gegenüber auf 97° erhitzter bzw. nicht vorbehandelter Kleie herabgesetzt. Um näher in Erfahrung zu bringen, wie der Grad der Erhitzung die Verdaulichkeit des Stickstoffs beeinflusst, wurde folgender Versuch gemacht.

Es wurden Proben zu 1 g unbeh. K. abgewogen und für eine Stunde in den Thermostat gestellt. Die Temperatur im Thermostat wechselte zwischen 51° und 253°. Nach der Erhitzung wurden die Proben in Zentrifugenröhren mit 25 ml Volumen, die als Verdauungsgefässe dienten, gebracht. Als Verdauungsflüssigkeit wurde teils Pepsin-Salzsäure (pH 1,7), teils Trypsin-Natriumbicarbonatlösung (pH 8,1) verwendet. Die Verdauungszeit: 2 Stunden. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 20 verzeichnet.

TABELLE 20.

Temp. im Thermostat (Zeit im Thermostat 1 Stde.)	Ausgelöste N-Menge in % der ursprüngl. Menge nach 2ständiger Verdauung mit:				
	Pepsin-Salzsäure (pH 1,7)			Trypsin-Natriumbicarbonatlösung (pH 8,1)	
51°	31,8	32,8	32,3	51,9	53,4
76°	33,2	33,1	32,3	48,9	50,3
97°	33,8	32,5	32,3	49,2	48,8
125°	29,5	29,4	28,8	40,8	40,4
148°			19,6		26,4
175°			15,8		16,2
200°			10,0		7,6
221°			6,9		5,7
253°			5,5		

Eine experimentell begründete Erklärung der zu hohen Werte bei Bs-Bestimmung ohne Farbstoffzusatz für gewisse Enzyme oder der Natur der Farbstoffwirkung vermag ich gegenwärtig nicht zu geben. Beide Erscheinungen werden indessen den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass der beste Farbstoffgehalt (in der Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung) 50  $\gamma$ /ml (= 1 : 20000) ist. Auch 70  $\gamma$ /ml gibt richtige Bs-Werte. Steigert man die Farbstoffkonzentration beträchtlich darüber hinaus, so ergeben sich unregelmässige, bisweilen falsche Analysenergebnisse. Doch darf der Farbstoffgehalt nicht weniger als 50  $\gamma$ /ml sein, wie nachstehende Tabelle zeigt.

Zusatz $\gamma$ Bs	Analysergebnis; $\gamma$ Bs			
	ohne Farbstoff	mit Farbstoff 15 $\gamma$ /ml	30 $\gamma$ /ml	50 $\gamma$ /ml
118,1	133	129	126	121

(Sämtliche hier angegebenen Resultate sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen.)

Wir haben bei der Bs-Bestimmung eine Farbstoffkonzentration von 50  $\gamma$ /ml verwendet (wie oben gesagt, ist hier die Farbstoffkonzentration der Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung gemeint, nicht die des Reaktionsgemisches).

Bei der Ausarbeitung der Bs-Bestimmungsmethode erhielten wir anfangs in einzelnen Fällen Enzyme, die trotz diesem Farbstoffzusatz bei den Kontrollanalysen zu hohe Bs-Werte lieferten. Wir nahmen an, dass die unbekannte Ursache dessen darin liege, dass in diesen Fällen höhere Konzentrationen bestanden als sonst, und wir versuchten diese Störung teils durch Zusatz einer grösseren Menge Dichlorophenolindophenol zu beseitigen, teils dadurch, dass wir durch Verdünnen der Enzymlösung den fraglichen Faktor abschwächten. Die nachstehende Tabelle verzeichnet die Ergebnisse solcher Versuche.

TABELLE 4.

	Analysergebnis; $\gamma$ Bs		
	nach 1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.
Unverdünntes Enzym Farbe 50 $\gamma$ /ml	130	122	111
Enzym $\frac{1}{15}$ M/15 Phosphat pH 7,3 = 1 $\frac{1}{1}$ Farbe 50 $\gamma$ /ml	117	119	
Enzym wie oben verdünnt; Farbe 200 $\gamma$ /ml	77	76	

Strömungsgeschwindigkeit = 5 Liter pro 4 Tage. Nach dieser Zeit wurde die Kleie wiederum quantitativ herausgenommen, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und bei Zimmertemperatur mit Ventilator auf konstantes Gewicht getrocknet. Der Kleierückstand wog 161,6 g. Somit sind bei dieser Verdauung 60 % der Gesamtmenge ausgelöst worden. 88,3 % der ursprünglichen N-Menge waren verdaut. Bei Wiederholung des Versuches wurden 88,7 % der ursprünglichen Stickstoffmenge verdaut.

Der Versuch zeigt also, dass annähernd  $\frac{9}{10}$  des Stickstoffs der Weizenkleie mit Pepsin-Salzsäure und Trypsin-Natriumbicarbonatlösung verdaut werden können (siehe weiter S. 90).

### 7. Verdauungsversuche mit Weizengluten.

Vergleichshalber habe ich auch einen Verdauungsversuch mit Weizengluten ausgeführt.

Das Gluten wurde durch Waschen von Weizenmehl (Kungsörnen, Malmö stora valskvarn) unter fliessendem Wasser gewonnen. Die Wäsche wurde bis zur völligen Klarheit des Waschwassers fortgesetzt. Das so in bestmöglichem Grade von Stärke befreite Gluten wurde dann in dünner Schicht bei Zimmertemperatur unter Ventilation getrocknet. Anschliessend wurde es zweimal auf der Handmühle gemahlen und dann in einem wohlverschlossenen Glase aufbewahrt. Die Partikelchen waren grösser als die der entsprechend behandelten Weizenkleie: 19 % des Glutens passierten ein Sieb mit 0,3 mm Fadenabstand und 91 % ein Sieb mit 1 mm Fadenabstand. Das erhaltene Präparat enthielt 117,5 mg N pro 1 g. Von diesem Gluten wurden 24 Proben zu je 0,5 g abgewogen. 8 solche Proben wurden für eine Stunde bei 97° in den Thermostat gestellt, 8 andere ebenfalls für eine Stunde bei 170°. Die restlichen 8 Proben wurden nicht mit Hitze behandelt. Von jeder Gruppe wurden dann 4 Proben mit 15 ml Pepsin-Salzsäure (pH 1,7) in Zentrifugenröhren von 25 ml Volumen verdaut. Die übrigen Proben wurden analog mit Trypsin-Natriumbicarbonatlösung (pH 8,1) ausgelöst. Die Digestionszeit betrug 1, 2, 3 und 4 Stunden (Tab. 21).

Der Versuch zeigt, dass Endospermeiweiss durch einstündige Erhitzung auf 97° nicht an Verdaulichkeit einbüsst; sowohl Pepsin als Trypsin verdauen praktisch gleich grosse Mengen des auf 97° erhitzten Weizenglutens wie des nicht vorbehandelten. Erhitzt man dagegen Weizengluten 1 Stunde lang auf 170°, so

der Bs-Menge der Probe. Hier bedienen wir uns statt dessen des Unterschieds im Ceriverbrauch zwischen Enzym + Analysenprobe und Enzym + Analysenprobe + Malonat. Das folgende Beispiel mag das Verfahren beleuchten: das sich nur un-erheblich von dem früher beschriebenen unterscheidet. Gleich-zeitig wird die zufriedenstellende Genauigkeit bei dieser Modi-fikation der Technik veranschaulicht.

TABELLE 5.

Zugesetzte $\gamma$ Bs	Analysergebnis $\gamma$ Bs	
	mit der »Malonat-Methode«	mit der ursprünglichen Methode
118,1	123	133
	124	139
	114	140
	112	135
59,0	64	75
	65	84
29,5	28	47

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Zu diesem Versuch sind 4 verschiedene Enzymlösungen verwendet worden.

Man kann dieses Verfahren entweder ständig gebrauchen, oder auch nur bei den Enzymlösungen, die es unbedingt erfordern. (Siehe unten S. 62 über die Verwendung verschiedener Modifikationen.) Aus dem Obigen geht hervor, dass man für jede Enzymlösung Kontrollanalysen einer bekannten zuge-setzten Menge Bs ausführen muss. Ich habe dies regelmässig getan und ausserdem in der Regel solche Kontrollbestimmungen auch jeden Tag gemacht. So kann man versichert sein, dass das Enzym durch die Aufbewahrung nicht gelitten hat. Für diese Analysen habe ich Doppelbestimmungen von 1 ml 0,001-m. Succinat (= 118,1  $\gamma$  Bs) gemacht.

Die Darstellung der Enzymlösung ist der schwache Punkt dieser Methode zur Bs-Bestimmung. Um ein richtiges Enzym zu erhalten, ist es von grösster Bedeutung. Fleisch von guter Qualität zu verwenden (Fleisch von einem älteren Tier, ohne Sehnen und Fett). Infolge der ungewöhnlichen Verhältnisse war es in den letzten Monaten sehr schwierig, für die Enzym-berereitung vollwertiges Pferdefleisch zu erhalten. Bei Bs-Bestimmung von 118,1  $\gamma$  Bs mit Enzymen aus schlechtem Fleisch liegen die erhaltenen Bs-Werte entweder 10—15 % zu niedrig

6. Weizenkleie, die 1 Stunde lang auf  $97^{\circ}$  oder niedrigere Temperaturen erhitzt wird, büsst praktisch nichts an Verdaulichkeit ein.

7. Vierstündige Erhitzung auf  $97^{\circ}$  verändert die Verdaulichkeit der Kleie nicht.

8. Weizenkleie, die 1 Stunde lang auf  $125^{\circ}$  oder höhere Temperaturen erhitzt wird, ist schlechter verdaulich. Diese Einschränkung der Verdaulichkeit ist sehr beträchtlich und wird mit steigender Erhitzungstemperatur immer stärker.

9. Die Verdaulichkeit von Weizengluten bleibt bei einstündiger Erhitzung auf  $97^{\circ}$  unverändert, wird aber bei einstündiger Erhitzung auf  $170^{\circ}$  stark eingeschränkt.

10. Nach einstündiger Verdauung unter identischen Bedingungen steigt die prozentual ausgelöste N-Menge bei Weizenkleie langsamer an als bei Auslösung aus Weizengluten. Die Erklärung ist wahrscheinlich darin zu suchen, dass die Kleizellenmembranen die Verdauung erschweren.

## B. Die Auslösbarkeit des Calciums und Magnesiums aus Weizenkleie.

### 1. Verdauungsversuche ohne Erneuerung der Auslösungsflüssigkeit.

In diesen Versuchen sind 2g Weizenkleie mit 30ml Auslösungsflüssigkeit bei  $37^{\circ}$  verdaut worden. Die Bedeutung der Erhitzung für die Auslösbarkeit der besagten Stoffe wurde an folgendem Untersuchungsgut ermittelt:

- a) Nicht erhitzte Weizenkleie (= unbeh. K.)
- b) Weizenkleie, die 1 Stunde lang auf  $170^{\circ}$  erhitzt worden war (= K.  $170^{\circ}$ ).

Verdauungszeit: 2 und 3 Stunden.

Als Verdauungsflüssigkeiten haben gedient:

1. Salzsäure, pH 1,7.
2. Dest. Wasser, pH 6.
3. Natriumbicarbonatlösung, pH 8,1.
4. 1‰ Pepsin (Schwed. Pharmakopoe) in Salzsäure, pH 1,7.
5. 1‰ Trypsin (Merck) in Natriumbicarbonatlösung, pH 8,1.
6. Menschl. Magensaft.
7. Menschl. Duodenalsaft.

strates (siehe LEHMANN 1929 und 1930), ist in der Regel zugleich mit der Aktivität untersucht worden. Hierdurch wird kontrolliert, dass das Enzym nur wenig „Spontanwasserstoffdonatoren (Spontandonatoren)“ enthält. Niedriger Gehalt an Spontandonatoren (= lange Entfärbungsdauer im Spontanreduktionsversuch) ist ein Zeichen dafür, dass die Muskulatur vor der Enzymextraktion genügend gewaschen worden ist. (Beim Waschen werden sowohl die Spontandonatoren als die wasserlöslichen Coenzyme entfernt.) LEHMANN hat für Methylenblau-Versuche nur Enzyme benutzt, deren „Spontanentfärbungszeit“ über 60 Minuten ist. Auch bei der Bs-Bestimmungsmethode ist diese Regel befolgt worden.

Die Enzymlösungen werden mit der Zeit von Mikroorganismen angegriffen, selbst bei einer Temperatur im Aufbewahrungsraum von  $+4^{\circ}$ . Ein Zeichen beginnender Zersetzung ist die Verkürzung der Spontanentfärbungszeit des Enzyms. Nach meiner Erfahrung gibt eine starke Verkürzung dieser Entfärbungszeit von einem Tage zum andern an, dass das Enzym unbrauchbar ist, selbst wenn die Zeit nicht unter 60 Minuten abgesunken ist. Ich verwende kein Enzym, dessen Spontanentfärbungszeit während der Aufbewahrung (beispielsweise von 4 Stunden auf  $1\frac{1}{2}$  Stunde) stark abgesunken ist. Wir berücksichtigen also mehr die *Veränderung der Spontanreduktion* während der Aufbewahrung des Enzyms, als die absolute Entfärbungszeit.

Ausserdem liefert die Farbe der Enzymlösung einen gewissen Anhalt für die Beurteilung dessen, ob das Enzym nach einiger Aufbewahrung brauchbar ist oder nicht. Frische Enzymlösungen haben eine graurote Farbe. Bei beginnender Zersetzung verschwindet der rote Ton und die Lösung ist rein blassgrau.

*Der pH des Reaktionsgemisches:* Die Analyse der Succinatlösung bei verschiedenem pH und 118,1  $\gamma$  Bernsteinsäurezusatz geht aus folgender Tabelle hervor:

TABELLE 7.

pH des Reaktionsgemisches	Analyseresultat: $\gamma$ Bs	
	nach $\frac{1}{2}$ Stde.	nach 1 Stde.
6,47	101	117
7,25	113	115
7,73	119	120

(Die angegebenen Bs-Werte sind das Mittel aus zwei Bestimmungen.)

Stunden lang mit Duodenalsaft verdaut, und zwar je eine Probe von unbeh. K. und K. 170° während jeder der genannten Zeiten. Nach beendigter Verdauung wurde die Kleie wiederum zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Calciummenge wurde in der verdauten Weizenkleie sowie in jeder Verdauungsflüssigkeit für sich nebst dem dazugehörigen Waschwasser bestimmt. Die ausgelöste Menge Calcium wurde berechnet. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 23 verzeichnet.

TABELLE 23.

Verdauungszeit		Ausgelöste Calcium-Menge in % der ursprüngl. Menge aus:	
Magensaft, pH 1,7	Duodenalsaft, pH 8,2	unbeh. K.	K. 170°
3 Stdn.		57	59
	2 Stdn.	<u>4</u>	<u>4</u>
		Zusammen: 61	63
3 Stdn.		59	59
	4 Stdn.	<u>2</u>	<u>4</u>
		Zusammen: 61	63

Auch dieser Versuch zeigt, dass Erhitzung die Auslösbarkeit von Calcium aus Weizenkleie nicht beeinflusst.

*Magnesium.* Tabelle 24 gibt die aus unbeh. K. und K. 170° in Verdauungsversuchen ausgelöste Magnesiummenge in Prozent der ursprüngliche Menge an. Die Analyse des in diesem Versuch verwendeten Magen- und Duodenalsaftes ergab folgende Werte: für den Magensaft einen ursprünglichen pH von 3,4, der auf 1,7 korrigiert wurde. Magnesiumgehalt 0,35 mg/10 ml. Duodenalsaft: pH 8,3, Magnesiumgehalt = 0,05 mg/10 ml.

Es ist festzustellen, dass für das Magnesium dasselbe gilt, was bereits für das Calcium konstatiert wurde, nämlich:

a) Erhitzung während 1 Stunde auf 170° ist für die Auslösbarkeit von Magnesium aus Weizenkleie belanglos.

b) Magnesium wird am besten in saurem und sehr schlecht in alkalischem Milieu (pH 8,1) ausgelöst.

c) Pepsin und Trypsin sind auf die Auslösbarkeit des Magnesiums ohne Einfluss.



Reaktionszeit 60 Min. gewählt, nach welcher Zeit auch die Umsetzung von 236  $\gamma$  in der Regel abgeschlossen ist. Bei Bestimmung grösserer Bernsteinsäuremengen spielen andere Faktoren mit, auf die ich weiter unten zurückkomme.

Aus der Tabelle 8. geht hervor, dass die Ausbeute auch konstant ist, nachdem das richtige Niveau erreicht ist.

*Bestimmung grösserer Bs-Mengen* (obere Kapazitätsgrenze der Methode): Die zugesetzte Menge Ferricyanid genügt, um mit etwa 500  $\gamma$  Bs zu reagieren. Theoretisch könnte die Methode also zur Bestimmung von Mengen zwischen etwa 5 und 500  $\gamma$  brauchbar sein. Es hat sich indessen gezeigt, dass man bei grösseren Succinatmengen, z. B. 470  $\gamma$ , eine Ausbeute erhält, die 10—15 % unter dem berechneten Wert, d. h. der zugesetzten Bs-Menge, bleibt.

Bei einzelnen Enzymen kann man dieselbe Erscheinung, obwohl weniger auffällig, auch bei Bestimmung von 236  $\gamma$  Bs beobachten, doch haben wir sie nie bei Bestimmung kleinerer Bs-Mengen, 118  $\gamma$  oder weniger, gesehen. Die Ursache dieser Verluste könnte in nicht genügend langer Reaktionszeit zu suchen sein. Oder die in diesen Fällen gebildete relativ grosse Fumaratmenge kann durch Adsorption an das Enzym allmählich den grösseren Teil der Enzymfläche „blockieren“ und so den letzten Abschnitt der Bs-Dehydrierung verhindern oder verlangsamen. Das Analyseergebnis ändert sich nicht, mag man nun die Enzymmenge oder die Reaktionszeit verdoppeln. Die Ergebnisse sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

TABELLE 9.

Zugesetzt $\gamma$ Bs	Analyseergebnis: $\gamma$ Bs				nach 1 Stde. mit 1,0 ml En- zymlösung
	nach 1 Stde.	nach 2 Std.n.	nach 3 Std.n.	nach 4 Std.n.	
236,1	203	213	216	213	
472,2	425	425			412

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen. Aktivität der Enzymlösung 5 1/2 bzw. 7 1/2 Minuten.

Gegenwärtig kann ich dieses Phänomen nicht erklären, doch werde ich ihm weitere Untersuchungen widmen. Die praktische Folge diesbezüglich dürfte sein, dass man sichere Bestimmungsergebnisse also nur für Werte um 200  $\gamma$  und darunter erhält. Bei höheren Succinatmengen kann man entweder den gefundenen Wert als ungefähren Wert und um 10—15 % zu

TABELLE 25.

Dialysierflüssigkeit	Ausgelöst in % der ursprüngl. Menge nach:			
	2täg. Dialyse		4täg. Dialyse	
	Calcium	Magnesium	Calcium	Magnesium
Dest. Wasser	21	58	32	80
0,1 n Salzsäure	76	81	82	86

TABELLE 26.

Dialysenzeit	Durch Dialyse von unbeh. K. mit 0,1 n Salzsäure unter ständigem Umrühren ausgelöste Menge in % der ursprüngl. Menge:	
	Calcium	Magnesium
2 Tage	98	96
4 „	100	97

Der Versuch wurde mit 0,1 n Salzsäure als Auslösungsflüssigkeit wiederholt (Tab. 25).

In einem sonst wie der obige ausgeführten Versuch wurde Stickstoffgas langsam vom Boden her durch die Dialyshülse geleitet, so dass sich die Kleie während der Dialyse in ständiger Bewegung befand (Tab. 26).

In dem schon auf S. 38 beschriebenen Verdauungsversuch, in welchem Weizenkleie 8 Tage lang verdaut wurde, zuerst mit Pepsin-Salzsäure und dann mit Trypsin-Natriumbicarbonatlösung, wurde auch die Menge des ausgelösten Calciums und Magnesiums bestimmt. Die dabei gefundenen Werte waren:

Ausgelöste Menge Calcium

in Prozent der ursprünglichen Menge: a) 99 b) 98.

Ausgelöstes Magnesium

in Prozent der ursprünglichen Menge: a) 99 b) 98.

Die hier angeführten Versuche zeigen also, dass in passendem Ionenmilieu die Calcium- und Magnesiumsalze der Weizenkleie praktisch 100%ig ausgelöst werden können.

### Zusammenfassung.

Durch Verdauung bei 37° von nicht vorher erhitzter sowie während einer Stunde auf 170° erhitzter Weizenkleie ist die Auslösbarkeit von Calcium und Magnesium bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration untersucht worden. Als Auslösungsflüs-

Dies hat zur Folge, dass man, wenn die Proben längere Zeit (mehrere Stunden bis einen Tag) nach der Eiweissfällung aufbewahrt werden, auch die Enzym-Wasser-Kontrolle ebenso lange aufbewahren muss. (Wird diese sofort, die Analysenprobe hingegen erst beispielweise nach 24 Stunden titriert, so ergeben sich folglich zu hohe Bs-Werte.) Dass man auch richtige Bs-Werte bei Aufbewahrung der Proben bis 24 Stunden nach der Eiweissfällung erhält, zeigt die Tabelle 12, S. 48. Die Analysen von 14,8  $\gamma$  Bs sind sämtlich erst 24 Stunden nach dem Zusetzen der Trichloressigsäure titriert worden.

*Die Schwefelsäurekonzentration beim Titrieren:* Bei der Arbeit an seiner Milchsäurebestimmungsmethode (LEHMANN, 1938) hat LEHMANN<sup>1</sup> einige Beobachtungen betreffend die Ceritrierung gemacht, die auch bei der Bestimmung von Bs beachtet werden müssen. Das Titrierverfahren ist ja in beiden Methoden das gleiche. Die Probe erfährt während des Trierens eine gewisse Verdünnung infolge des Ceriverbrauchs. Da die Probelösung durch den Schwefelsäurezusatz (über das Titrierverfahren siehe S. 32) saurer ist, als die Cerisulfatlösung, die für die Titration benutzt wird, verringert sich hierdurch die Acidität der Probe successiv. *Bei starker Abnahme der Acidität steigt der Ceriverbrauch.* Deshalb muss ein gewisser Überschuss von 18-n. Schwefelsäure zugesetzt werden. Bei einem Ceriverbrauch von etwa 2 ml darf die zugesetzte Menge 18-n. Schwefelsäure 3 ml nicht unterschreiten, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

TABELLE 11.

ml 18-n $H_2SO_4$ zugesetzt	ml Cerisulfatlösung ver- braucht bei der Titrierung
1	2,042
2	1,954
3	1,874
5	1,875
6	1,874

Als „Probe“ 2 ml Mohrsche Gebrauchslösung wie bei Titerstellung der Cerisulfatlösung. Totalvolumen vor der Titrierung 8 ml, nachher ungefähr 10 ml. (Bei dieser Titrierung wurde Setoglaurin 0 als Indikator verwendet.)

<sup>1</sup> Persönliche Mitteilung.

## Kap. II.

### Tierversuche.

Durch die in vitro-Versuche wurde festgestellt, dass  $\frac{9}{10}$  der in Weizenkleie enthaltenen Stickstoffprodukte mit Pepsin + Trypsin verdaut werden können, sowie ferner, dass einstündige Erhitzung der Kleie auf  $125^{\circ}$  und höhere Temperaturen die Verdaulichkeit der Stickstoffprodukte einschränkt. Die Auslösbarkeit der Calcium- und Magnesiumsalze aus Weizenkleie ist von einer etwaigen Erhitzung der Kleie unabhängig. Sie lassen sich praktisch hundertprozentig durch Dialyse in saurem Milieu ausziehen. Die proteolytischen Enzyme beeinflussen die Auslösbarkeit der genannten Salze nicht. Daraus darf man natürlich nicht folgern, dass sich die Verhältnisse im Darmkanal entsprechend gestalten. Die Versuche in vitro zeigen nur, dass unter gewissen günstigen Bedingungen die Möglichkeit guter Auslösbarkeit sowohl der Stickstoffprodukte als der Calcium- und Magnesiumsalze aus Weizenkleie besteht.

Weizenkleie enthält wie gesagt Ballaststoffe in grosser Menge. Diese vermehren die Fäkalienmenge und fördern die Peristaltik; sie verkürzen also den Aufenthalt der Nahrung im Verdauungskanal und damit die Verdauungszeit. Auch eine verstärkte Absonderung von Darmsäften bewirken sie. Durch Erhitzung wird die Verdaulichkeit der Stickstoffprodukte der Weizenkleie geschädigt. Gleichzeitig werden Röstprodukte gebildet, die ebenfalls die Darmsaftsekretion und die Peristaltik anregen. Stehen die Darmsäfte in reichlicherer Menge zur Verfügung, so wird auch die Verdauung intensiver vor sich gehen, wenn die Enzymmenge im Verhältnis zur Menge der Verdauungsflüssigkeit zunimmt. Es wäre also eine bessere Auslösung der in der Weizenkleie enthaltenen Stoffe zu erwarten. Andererseits enthalten die Verdauungssäfte u. a. Stickstoff, Calcium und Magnesium. Eine vermehrte Darmsaftsekretion steigert also den Verlust an diesen Stoffen mit den Faeces, soweit sie nicht wieder resorbiert werden.

TABELLE 12.

Zugesetzte $\gamma$ Bs:	236,1	118,1	14,8
Analysergebnis: ( $\gamma$ Bs)	236,7	117,3	16,7
	234,6	119,0	16,1
	233,9	118,5	16,1
	235,2	117,5	14,0
	236,5	116,3	15,4
	236,1	118,3	16,7
	238,9	118,9	16,5
	236,5	118,4	16,5
	237,5	119,1	16,0
	234,6	118,6	15,1
Mittl. Werte:	236,1	118,2	15,9
Mittl. Fehler:	1,5	0,9	0,9

Als Probelösung wurde 1 ml 0,002-m., 0,001-m., bzw. 0,00125-m. Succinat-lösung verwendet. Der hierbei verwendete Enzym-Wasser-Wert ist Mittelwert aus 4 Enzym-Wasser-Kontrollen. Der mittlere Fehler dieses Mittelwertes wurde berechnet;  $\Sigma_M = \pm 0,65 \gamma$  Bs.

Der mittlere Fehler einer Doppelbestimmung:  $\frac{\sigma}{\sqrt{2}} = \pm 1,1 \gamma$  Bs

Der Fehler bei Bestimmung des Enzym-Wasser-Wertes muss aber auch beachtet werden. Der ganze mittlere Fehler einer Doppelbestimmung ist somit:

$$\sqrt{\frac{1,5^2}{2} + 0,7^2} = \pm 1,3 \gamma \text{ Bs.}$$

Bei diesen kurzen Versuchsreihen entspricht der gefundene Wert  $\pm 3 \sigma$  nicht immer den theoretischen. In diesem Falle ( $n-1 = 9$  bzw.  $n-1 = 3$ ) muss man statt dessen mit  $\pm 3,8 \sigma$  rechnen.

$$\pm 3,8 \sigma = \pm 4,9 \gamma \text{ Bs.}$$

Der mittlere Fehler bei Bestimmung von Bs in Serum und Plasma ist aus 138 Doppelbestimmungen berechnet. Es wurden stets 2 Bestimmungen des Enzym-Serum-Wertes und 2 Bestimmungen des Enzym-Serum-Malonat-Wertes ausgeführt. Die mittleren Fehler der Differenz zwischen den beiden Bestimmungen im ersten und zweiten Falle wurden berechnet ( $\sigma_B$ , bzw.  $\sigma_{M_1}$ )

$$\sigma_B = \pm 5,0 \gamma \text{ Bs.}$$

$$\sigma_{M_1} = \pm 4,5 \gamma \text{ Bs.}$$

TABELLE 28.

*Kostmischungen.*

	Kost 1		Kost 3		Kost 4	
	a	b	a	b	a	b
Weizenkleie					350	350
Reismehl	696	696	685,6	693,6	340	340
Kasein	150	150	150	150	116	116
Arachisöl	37	37	37	37	37	37
Fischlebertran (Leo)	3	3	3	3	3	3
Weizenkeime	30	30	30	30	30	30
Zucker	10,6	18,6			45	61,1
Hagebuttenmehl	5	5	5	5	5	5
Hefe	30	30	30	30	30	30
Zellulosefaser			21	21		
Salzmischung	31,4	30,4	31,4	30,4	29	27,9
Natriumbicarbonat	7		7		15	
	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>

Kostmischung 2 = Kost 1 + 2 mg Aneurin (Astra) und 2,5 mg Lactoflavin (Hoffmann—La Roche) pro kg Kostmischung.

Kostmischung 5 = Kost 4, doch waren die 350 g Weizenkleie gegen eine gleiche Menge während einer Stunde bei 170° geröstete Kleie ausgetauscht. Der beim Rösten entstandene Wasserverlust, etwa 10 %, wird durch destilliertes Wasser ersetzt.

Kostmischung 6 = Kost 4, in Brötchen von etwa 50 g 1 Stunde bei 170° gebacken.

*Salzmischungen.*

	Kost 1a—3a	Kost 1b—3b	Kost 4a—6a	Kost 4b—6b
Natriumchlorid	83	83	83	83
Natriumsulfat, krist.	148	148	148	148
Kaliumphosphat, prim.		78,1		86,3
Kaliumphosphat, sek.	100		110,5	
Calciumlactat	250	250	235,7	235,7
Ferricitrat	35	35	35	35
Magnesiumoxyd	48	48		

von Natriumbicarbonat und Verwendung von sekundärem Kaliumphosphat mehr alkalogen gemacht worden. Die Ratte erhält bei dieser Kost einen Harn-pH, der gleich auf der alkalischen Seite von 7 liegt. Die zweite Variante der Kostmischungen (b) dagegen

Aktivitätsprobe) gearbeitet. Bei weniger aktiven Enzymlösungen haben wir uns der Bs-Konzentration des oben angegebenen Versuchs, 118  $\gamma$ , bedient.

Wird ein Stoff durch die Enzymlösung dehydriert, so geschieht dies entweder mit Hilfe der Succinodehydrogenase oder einer anderen in der Lösung vorhandenen Dehydrogenase. Welches die wirksame Dehydrogenase ist, entscheidet ein Versuch mit dem fraglichen Stoff und einer grösseren (siehe oben) Bs-Menge in derselben Probe. Wird die Substanz mit Hilfe der Succinodehydrogenase oxydiert und somit an diese adsorbiert, so wird infolge der langsameren Umsetzung dieses Enzym daran gehindert, innerhalb der Reaktionszeit auch die zugesetzte Succinatmenge zu oxydieren („das Enzym wird für Bs blockiert“). Wird dagegen der fragliche Stoff mit Hilfe einer anderen Dehydrogenase dehydriert, so bleibt die Succinatumsatzung unbeeinflusst. Es ergibt sich in diesem Falle eine Addition der Dehydrierung beider Stoffe, die im Endergebnis der Bestimmung abgelesen wird. (Dies unter der Voraussetzung, dass ein Überschuss an Wasserstoffacceptor, Ferricyanid, vorhanden ist.)

*Untersuchte Substanzen:* Folgende Gruppen von Stoffen sind hier von Interesse.

1. Substrate der übrigen in der Enzymlösung vorkommenden Dehydrogenasen
  - a) für Enzyme, die kein Coenzym benötigen,
  - b) für Enzyme, die Codehydrogenase I (Cozymase) benötigen,
  - c) für Enzyme, die Codehydrogenase II benötigen,
 (b) und c) bedeutet gleichzeitig Kontrolle darüber, dass die Enzymlösung durch das Waschen von Coenzym befreit ist).
- 2) Stoffe, die der Bs chemisch nahe stehen.
- 3) Stoffe, die im Organismus Bs bilden oder von Bs gebildet werden können.
- 4) Enzymgifte, die experimentell von Interesse sind.
- 5) Stoffe, die normal oder unter gewöhnlichen experimentellen Verhältnissen in Serum, Harn, Gewebsflüssigkeit o. dgl. vorkommen können und von diesem Gesichtspunkt aus von Interesse sind.

Nachstehend sind sämtliche untersuchten Substanzen verzeichnet. Diejenigen, die die Bs-Dehydrierung hemmen, sind mit einem — versehen, einerlei, ob sie selbst dehydriert werden oder nicht. Stoffe, die oxydiert werden, ohne die Succinatumsatzung zu beeinflussen, sind mit einem + bezeichnet. Die übrigen sind indifferent.

Säuren und Basen sind als Salze in neutraler Lösung verwendet worden, die Säuren in der Regel als Natriumsalz, die Basen in der Regel als Chloride.

jedoch, dass die Ausnützung eines Eiweissstoffes auch davon abhängt, welche anderen Eiweissstoffe gleichzeitig zugeführt werden.

Durch Kürzung der Calciumlactatmenge ist der Calciumgehalt in Kost 4 dem von Kost 1 angeglichen worden. 13,6 % des Gesamcalciums der Kost 4 werden von der Weizenkleie geliefert. Der Calciumgehalt der Kostmischungen ist überhaupt ziemlich niedrig. Dies, damit nicht die mit der Weizenkleie zugeführte Calciummenge einen allzu kleinen Anteil des Gesamcalciums der Kostmischungen ausmacht.

Der Magnesiumgehalt der Kost 4 wird dem in Kost 1 angeglichen, indem das mit der Salzmischung zugeführte Magnesium aus Kost 4 entfernt wird. Der Magnesiumgehalt der Kleie macht 73,9 % des gesamten Magnesiumgehalts dieser Kost aus.

*Kost 6.* Um den etwaigen Einfluss der Erhitzung auf die hier in Rede stehenden Stoffe festzustellen, wurden aus Kostmischung Brötchen gebacken. Dabei wird die Kostmischung mit destilliertem Wasser zu einem passenden Teig verrührt. Aus etwa 50 g Kostmischung werden Brötchen geformt und 1 Stunde bei einer Temperatur, die 170° nicht übersteigt, gebacken. Die Temperatur im Innern des Brötchens steigt auf 97—99° an. Die Kruste macht etwa 50 % des Trockengewichtes des Brötchens aus. Die Brötchen werden zerkrümelt, an der Luft getrocknet und zu einem ziemlich groben Mehl vermahlen, das hier als Kost 6 bezeichnet wird.

*Kost 5.* Bei diesem Verfahren wird indessen nicht nur die Kleie, sondern die ganze Kostmischung der Erhitzung ausgesetzt. Um prägnanter den Einfluss der Erhitzung gerade auf die Kleie untersuchen zu können, wurde folgende Kostmischung bereitet: Weizenkleie, in dünner Schicht auf ein Blech ausgebreitet, wird im Ofen 1 Stunde lang bei 170° erhitzt. Der Wasserverlust, den die Kleie bei dieser Behandlung erleidet, wird durch die entsprechende Menge dest. Wasser ersetzt, bevor die geröstete Kleie in die Kostmischung gemengt wird. Diese Kost ist dieselbe wie Kost 4, nur mit dem Unterschied, dass die 35 % unbeh. Weizenkleie hier mit der entsprechenden Menge gerösteter Weizenkleie ersetzt sind. Diese Kostmischung bezeichne ich als Kost 5.

### A. Wachstumsversuche.

Die in diesen Versuchen verwendeten Ratten werden in Gruppen zu je 4 Tieren aufgeteilt. Es wurde versucht, in jeder Gruppe



Phenolphthalein	Kahlbaum. 3 Tropfen 1 ‰ Lösung in Alkohol pro ml Aqua redest.
Propionsäure	Kahlbaum
— Pyrophosphorsäure	Natriumpyrophosphat Kahlbaum
dl-Serin	Hoffman la Roche
+ Tartronsäure	B. D. H.
Urethan	Merek
n-Valeriansäure	Kahlbaum
Weinsäure	Kalium-Natrium-Tartrat Kahlbaum pro analysi

Die Wirkung der Stoffe, die auf die Bs-Bestimmung von Einfluss waren, wurde näher untersucht; die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

TABELLE 13.

Substanz	Substanz allein $\mu$ Mol.		10 $\mu$ Mol. Substanz + $\gamma$ Bs			Differenz in $\gamma$ Bs zwischen 10 $\mu$ Mol. Substanz und	
	2	10	11,8	118,1	236,1	118,1 $\gamma$	236,1 $\gamma$ Bs
Aconitsäure .....	0	0	—	39	—	—79	—
Apfelsäure .....	3	5	18	—	—	—	—
	1	0	—	—	—	—	—
Äthylbernsteinsäure .....	—	9	—	124	241	—	—4
	—	2	—	—	211	—	—27
Fumarsäure .....	3	4	18	116	—	—6	—
	—	2	—	89	—	—31	—
Hexosediphosphorsäure .....	98 <sup>1</sup>	—	—	201 <sup>1</sup>	—	—15 <sup>1</sup>	—
	96 <sup>1</sup>	—	—	184 <sup>1</sup>	—	—30 <sup>1</sup>	—
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure	32	49	57	—	140	—	—145
Malonsäure .....	—	0	—	3	—	—115	—
Methylbernsteinsäure .....	8	7	—	128	226	+3	—17
Oxalessigsäure ...	6 <sup>2</sup>	—	—	—	3 <sup>2</sup>	—	—239 <sup>2</sup>
Oxalsäure .....	—	2	—	83	—	—37	—
l- $\alpha$ -Oxiglutarinsäure	9	15	—	134	—	+1	—
Pyrophosphorsäure .....	—	—	—	5	—	—113	—
Tartronsäure .....	—	10	—	—	215	—	—1

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass nur ein Stoff, nämlich Hexosediphosphat, in etwa demselben Umfang wie Bs de-

<sup>1</sup> 0,5 Mol.<sup>2</sup> 2,5 Mol.

alt, die andere aus 1 Männchen und 3 Weibchen. Die Ratten dieser letzteren Gruppe waren bei Beginn des Versuchs 27 Tage alt und wurden direkt von der Mutter genommen. Bei diesen Versuchen wurden die Tiere einzeln gehalten. Wenn nämlich ein Tier verendet, so fressen die anderen von dem Kadaver, was hier eine unnötige Fehlerquelle hereinbringen würde.

Das Wachstum der Tiere ist in Fig. 1 graphisch dargestellt. Die jüngeren Tiere zeigen sämtlich Gewichtsschwund und gehen alle innerhalb von 5 Wochen nach Beginn des Versuchs ein. Das Männchen und eines der Weibchen sterben schon nach einer Woche. Die älteren Tiere verlieren allmählich an Gewicht; die Männchen mehr als die Weibchen. Die Männchen sterben nach 13 bzw. 18 Wochen nach Beginn des Versuchs; die Weibchen dagegen leben noch nach 25 Wochen. In den letzten 2 Monaten haben sie langsam wieder zugenommen und bei Abschluss des Versuchs ihr Anfangsgewicht wieder erreicht. Dem Aussehen nach waren sämtliche Tiere — auch die Weibchen — während der Dauer des Versuchs bei schlechter Kondition. Sie waren apathisch, hatten einen struppigen Pelz und verloren Haare. Die Weibchen wurden mit gesunden Männchen gepaart, ohne jedoch gravid zu werden.

## 2. Versuche mit Weizenkleie + 1 % Fischlebertran.

In einer anderen Reihe wurden die obigen Versuche wiederholt, doch war der Kleie hier 1 % Fischlebertran (Leo) zugesetzt worden. 3 Weibchen und 1 Männchen wurden im Alter von 1 Monat von der Mutter genommen und in Einzelkäfigen mit der genannten Kost gefüttert. Das Männchen verendete nach 11 Tagen, während die drei Weibchen am Leben blieben. Ihre Wachstumskurve ist in Fig. 2 dargestellt. Diese Tiere zeigen eine gleichmäßige Gewichtszunahme, blieben aber klein von Wuchs (mittl. Gewicht 17.—21. Woche nach Versuchsbeginn =  $131 \pm 4,9$  g). Sie waren nicht besonders apathisch und hatten ein glattes Fell. Decken dieser Weibchen im Alter von  $7 \frac{1}{2}$  Monaten führte nicht zu Gravidität.

Weizenkleie allein erweist sich also als für das Wachstum der Tiere unzureichend, vermag aber erwachsene Weibchen während einer Zeit von  $> 25$  Wochen am Leben zu halten. Alle drei Männchen dagegen starben; zwei von ihnen waren ältere Tiere, eins gehörte der jüngeren Gruppe an. Ein Zusatz von 1 % Fisch-

die Oxydierung von Hexosediphosphat zu beeinflussen. Siehe Tabelle 14.

TABELLE 14.

Rohr-Nr.	1	2	3	4	5	6
Aqua redestillata .....	--	0,5	—	0,1	—	—
Succinat 0,002-mol. ....	0,5	—	—	—	—	—
Hexosediphosphat 0,001-mol.	—	0,5	0,5	—	—	—
Malonat 0,10-mol. ....	—	—	—	—	0,1	—
» 0,02-mol. ....	0,5	—	0,5	—	—	—
Kaninchenserum mit Hexosediphosphat 0,0005-mol. ....	—	—	—	0,9	0,9	—
Kaninchenserum, mit 118,1 $\gamma$ Bs pro ml und 0,01-mol. Malonat .....	—	—	—	—	—	1,0
Zugesetzt $\gamma$ Bs. ....	118,1	—	—	—	—	118,1
Analysenergebnis, als $\gamma$ Bs berechnet .....	1	102	105	74	69	0

Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, wird die Dehydrierung von Hexosediphosphat weder in rein wässriger Lösung noch in Serum durch die hier angewandten Malonatkonzentrationen beeinflusst. Vergleichsweise sei erwähnt, dass 0,001-molares Malonat im Reaktionsgemisch die Succinodhydrogenase unter denselben Versuchsbedingungen annähernd hundertprozentig hemmt.

Bei der ursprünglichen Technik erhält man den Unterschied im Ceriverbrauch zwischen der Enzym-Probelösung und der Enzym-Wasserlösung als Mass der Bs-Menge in der Analysenprobe. Hier verwenden wir statt dessen den Unterschied zwischen der Enzym-Probelösung und der Enzym-Probe-Malonatlösung. Da die Malonathemmung bisweilen nicht vollständig, sondern nur 96—97 %-ig ist, können die mit dieser Technik erhaltenen Bs-Werte um 3—4 % zu niedrig sein. Über Ausführung, Lösungen usw. siehe S. 64.

*Methode zur Bestimmung von Bs in Anwesenheit von  $\alpha$ -Ketoglutar säure:* In den bisherigen Methoden zur Isolierung (und Bestimmung) von  $\alpha$ -Ketoglutar säure hat man gewöhnlich die Reaktion der Ketogruppe mit irgendeinem Ketoureagens verwendet. Die dabei gebildete Verbindung wurde durch Ausfällung oder Extraktion von der Bs geschieden (KREBS u. JOHNSON

wärmestabil ist (BROWNING, 1931). In keinem Falle hat bei diesen Versuchstieren eine Schwäche in dieser Beziehung festgestellt werden können. Das Backen der Nahrung hat auch keine Verminderung der Stückzahl pro Wurf oder des Geburtsgewichtes der Jungen im Gefolge gehabt (Tab. 29).

TABELLE 29.

Kost der Mutter nach dem 1. Lebensmonat	Zahl der Würfe pro Gruppe	Zahl der Jungen pro Wurf	Mittl. Gew. der Jungen (g)
1	7	8,9	4,5
2	7	8,3	4,5
3	7	8,6	5,1
4	10	9,7	4,5
5	7	7,9	5,1
6	8	10,4	4,4

Das Geburtsgewicht der Jungen liegt bei sämtlichen Kostformen in oder über den von DONALDSON (1924) angegebenen Grenzen der Norm. Die Zahl der Jungen pro Wurf war in allen Gruppen normal und das Geburtsgewicht gut.

Wie gesagt, wurden die Tiere im Alter von 1 Monat von der Mutter genommen und dann ausschliesslich mit der betreffenden Kostmischung gefüttert. Die Wachstumskurven in Fig. 2 zeigen das Durchschnittswachstum der Weibchen bei Fütterung mit den einzelnen Kostmischungen. Vergleichshalber habe ich eine Kurve beigegeben, die aus DONALDSONS (1924) Werten der Albinoratten des Vistarininstituts zusammengestellt ist; die betreffenden Ratten erhielten eine Kost von »selected table scraps«. Die Kurven zeigen gipfelförmige Abweichungen, verursacht durch zeitweilige Gewichtsveränderungen bei Gravidität und Geburt. 4 der mit Kost 4 gefütterten Weibchen, 2 der mit Kost 6 und je 1 der mit den übrigen Kostmischungen gefütterten Weibchen haben je zweimal Junge bekommen. Vergleicht man die Gewichtskurve dieser Weibchen mit den anderen Weibchen derselben Gruppe, die nur einmal Junge bekommen haben, so sieht man hinsichtlich des schliesslichen Gewichts keinen Unterschied. Dagegen ist das Geburtsgewicht der Jungen beim zweiten Wurf etwas höher als beim ersten.

Bei sämtlichen Kostmischungen wachsen die Tiere anfangs schneller als die Tiere des Vistarininstituts. Nach 15 Wochen Fütterung mit der Versuchskost (im Alter von 19 Wochen)

der Bs zwischen Wasser und Äther ist etwa 5 bei 20°. Deshalb muss die Menge des Äthers bei der Extraktion im Verhältnis zur wässrigen Lösung klein sein, damit nicht zu viel Bs extrahiert wird. Dasselbe gilt für das Äthylacetat. Bei zweimaliger Extraktion mit  $\frac{1}{2}$  Volum Äther (KRENS 1938) werden, wenn man mit diesem Verteilungskoeffizienten rechnet, etwa 8 % Bs extrahiert, bei dreimaliger Extraktion mit derselben Menge (KRENS 1940) etwa 11 %. Es wäre also von einem gewissen Vorteil, wenn man ein anderes Extraktionsmittel für das 2:4-Dinitrophenylhydrazon finden könnte, das Bs weniger leicht löst.

Bs ist schwerlöslich in Amyläther, Chloroform und Toluol (ØNSKOV 1931). In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das 2:4-Dinitrophenylhydrazon der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure in Kohlentetrachlorid, Benzol, Toluol und Chlorbenzol praktisch *unlöslich* ist, in Amyläther, Isoamyläther und Chloroform *fast unlöslich*, in Amylalkohol, Essigsäureanhydrid *etwas löslich* und in Aceton, Äthylacetat, Äthyläther sowie in Chloroform, das 50, 10 und 5 Vol.% Äthylacetat enthält, *leichtlöslich*.

Da Bs in Chloroform schwerlöslich ist, wurden Versuche gemacht, aus einer Lösung von Bs und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure die letztere als 2:4-Dinitrophenylhydrazon mit Chloroform, das 5 Vol.% Äthylacetat enthält, auszuziehen. Um festzustellen, ob alle  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ausgezogen war, wurde der Rest nach der Extraktion mit Permanganat oxydiert. Darauf wurde die Bs-Bestimmung vorgenommen, nachdem die Bs mit Äther extrahiert worden war (Ausführung siehe S. 64). Es zeigte sich, dass bei der Extraktion praktisch alle Ketoglutarsäure entfernt worden war, während praktisch keine Bs ausgezogen war. Die Ergebnisse einer Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die angegebenen Bs-Werte sind Mittelwerte aus zwei Bs-Bestimmungen.

TABELLE 15.

Rohr-Nr.	1	2	3	4
Zugesetzt $\gamma$ Bs. ....	59,0	0	29,5	0
Zugesetzt $\alpha$ -Ketoglutarsäure (berechnet als $\gamma$ Bs) .....	0	59,0	29,5	0
Analysenergebnis: $\gamma$ Bs Rückstand nach der Extraktion ...	54	0	32	0
Chloroformextrakt .....	0	—	—	0

Die angegebenen Bs-Werte sind Mittelwerte aus drei oder vier Bestimmungen. — Um festzustellen, dass alle  $\alpha$ -Ketoglutarsäure extrahiert wor-

haben Gruppe 1 und 5 etwa dasselbe Gewicht wie die Vergleichstiere. Die mit Kost 6 gefütterten Tiere zeigen eine wenig niedrigere Gewichtskurve, die mit Kost 2 bzw. 3 und 4 gefütterten eine etwas höhere.

Das mittl. Gewicht der Rattenweibchen nach 18—21wöchiger Versuchsdauer (im Alter von 22—25 Wochen) ist aus Tabelle 30 zu ersehen.

TABELLE 30.

Kost Nr.	Mittl. Gew. d. Rattenweibchen, 18—21 Wochen nach Beginn der Fütterung mit der betreffenden Kost (g)
1	136 ± 9,5
2	216 ± 6,7
3	210 ± 4,9
4	212 ± 6,5
5	191 ± 7,0
6	180 ± 11,1

Wir finden folgendes: Kost 1 liefert ein ziemlich gutes Wachstum. Eine Sondergabe von Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (Kost 2) steigert das mittl. Gewicht der Ratten recht erheblich. Der Gewichtsunterschied beträgt 30 ± 11,6 g, ist also statistisch gesichert. Auch ein Zusatz von 2,1 % Faser (Kost 3) bewirkt ein verbessertes Wachstum. Die mit Kost 3 gefütterten Tiere wiegen 24 ± 10,7 g mehr als die mit Kost 1 gefütterten; die Signifikanz ist gut. Eine Beigabe von Faser in gewisser Menge zur Kost ermöglicht also ein verbessertes Wachstum.

Mit der Weizenkleie werden der Nahrung u. a. Rohfaser und Vitamin B zugeführt, die beide in gewissen Fällen die wachstumsfördernden Eigenschaften einer Kost zu stärken vermögen. Ob dies dadurch geschieht, dass die Fresslust der Ratten angeregt wird und die Wachstumssteigerung also durch vermehrte Nahrungsaufnahme bedingt ist, oder ob Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> sowie eine gewisse Menge Rohfaser eine bessere Ausnützung der Bestandteile der Nahrung ermöglichen, wird durch diesen Versuch nicht klargestellt. Die Frage wird in anderem Zusammenhang behandelt werden.

Fütterung mit Kost 4, bei der ein Teil der Bestandteile von Kost 1 durch Weizenkleie (35 %) ersetzt ist, wachsen die Tiere ebensogut wie mit Kost 2 und 3, folglich besser als mit Kost 1. Der Gewichtsunterschied zwischen mit Kost 4 und solchen mit

diesbezüglich in biologischem Material zu rechnen haben dürfte, sind  $\alpha$ -Oxyglutarsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure.

Umsetzung und Vorkommen der ersteren Säure ist, wie oben erwähnt wurde, wenig erforscht. KREBS (1938) gibt an, die Säure gehe bei Oxydation mit Kaliumpermanganat zu 88 % in Bs über. WEIL-MALHERBE (1937 c) hat dies nicht bestätigen können, sondern findet höchstens 40 % als Bs wieder.

Welche Rolle diese Säure als Fehlerquelle bei Bs-Bestimmungen nach vorheriger Oxydation mit Permanganat spielen kann, wissen wir nicht. Vermutlich keine grosse, denn erstens hat man diesen Stoff bisher nicht in Serum gefunden, zweitens wird er nur zum Teil in Bs oxydiert. Dieser unbekannte Faktor würde völlig ausscheiden, wenn die  $\alpha$ -Oxyglutarsäure von Malonsäure und Bs getrennt werden könnte. Eine geeignete Methode hierfür haben wir nicht finden können.

Die Rolle der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure im intermediären Stoffwechsel ist in den letzten Jahren eifrig erforscht worden (hauptsächlich durch Versuche in vitro). Aus den wenigen bisher ausgeführten in vivo-Versuchen mit Analysen von Serum geht hervor, dass die normale Konzentration im Serum des Menschen etwa 0,7—1,0 mg%, im Serum von Rindern 3—4 mg% beträgt (KREBS 1938, KARLSTUÖM et al. 1939, KNUSIUS 1940). Nach diesen wenigen Analyseergebnissen ist normal hinreichend  $\alpha$ -Ketoglutarsäure vorhanden, um bei Oxydation mit Permanganat verhältnismässig grosse Mengen Bs zu bilden und die Bestimmungsergebnisse stark zu beeinflussen. Die  $\alpha$ -Ketoglutarsäure muss also zunächst entfernt werden, bevor die Malonsäure oxydiert wird. Anschliessend wird die Malonsäure mit Kaliumpermanganat oxydiert. Die Bs wird wie oben mit Äther extrahiert und endgültig im Schaukelextrakt bestimmt. Für Ausführung, Lösungen usw. verweise ich auf S. 65.

Pyrophosphorsäure ist in dieser Arbeit nicht verwendet worden, da es sich gezeigt hat, dass sie die Succinodehydrogenase nicht spezifisch hemmt, entgegen der ursprünglichen Behauptung (LELOIN u. DIXON 1937). Die enzymatische Dehydrierung von  $\beta$ -Oxybuttersäure wird durch Pyrophosphat stark gehemmt (Literatur bei HOFF-JÖRGENSEN 1940). Deshalb haben wir keine Methode zur Bestimmung von Bs in Anwesenheit von Pyrophosphat ausgearbeitet. Eine solche würde sich jedoch ohne Schwierigkeit angeben lassen, da Pyrophosphorsäure in wässriger Lösung nach und nach spontan in Orthophosphorsäure übergeht. Es handelte sich also nur darum festzustellen, wie lange es dauert, bis diese Reaktion abgeschlossen ist.

### Anwendung der Methode auf biologisches Material.

Bei der Anwendung dieser Methode zur Bs-Bestimmung in biologischem Material (Plasma, Serum u. dgl.) kann man entweder das Enzym direkt auf die Bs in der Probe einwirken lassen, oder man kann zunächst durch irgendeinen Prozess die

zu fressen bekommen, sterben die Männchen nach 13 bzw. 18 Wochen, die Weibchen leben noch nach 25 Wochen.

*Weizenkleie + 1% Fischlebertran*: Ein Zusatz von 1% Fischlebertran steigert den nahrungsphysiologischen Wert der Weizenkleie so erheblich, dass man damit junge Ratten grossziehen kann, ohne andere Nahrungszuschüsse zu verfüttern. Die Tiere bleiben jedoch klein, und Paarung mit normalen Männchen bewirkt keine Gravidität. Die Kleie ist lysinarm. Die Ursache der Sterilität der Weibchen kann in dem vorliegenden Falle möglicherweise die mangelnde Lysinzufuhr sein, doch kann sie ebensogut in der allgemein geschwächten Vitalität liegen.

*Kostmischungen*: Versetzt man die Vergleichskost mit 2,1% Rohfaser, so nimmt das Wachstum der Tiere zu. Eine Sondergabe von 30—40  $\gamma$  Vitamin B<sub>1</sub> und 40—50  $\gamma$  B<sub>2</sub> pro Tier und Tag steigert das Wachstum in entsprechendem Grade. Versetzt man die Kost mit 35% Weizenkleie, so ist das Wachstum der Tiere ebenso gut wie bei Fütterung mit den beiden vorgenannten Kostmischungen. Die damit gefütterten Tiere befinden sich in vorzüglicher Verfassung. Erhitzt man die der Kost zugesetzte Weizenkleie, oder backt man die ganze Kleiekost, so verschlechtert sich das Wachstum der Tiere.

## B. Bilanzversuche.

Sämtliche Tiere der Wachstumsversuche wurden im Alter von 25 Wochen in Bilanzversuche übernommen. Während der ersten beiden Wochen liess ich die Tiere sich an die Versuchsbedingungen im Stoffwechsellkäfig gewöhnen. Bei Beginn der eigentlichen Bilanzversuche sind also die Tiere 27 Wochen alt und seit 23 Wochen mit der betreffenden Kostmischung gefüttert. Ihr Stoffwechsel dürfte also völlig auf die fragliche Kost eingestellt sein.

Während der Versuche werden die Ratten in gewöhnlichen Stoffwechsellkäfigen gehalten, die das Auffangen von Harn und Fäkalien für sich ermöglichen. Jede Versuchsperiode umfasst 4 Wochen. Während der Versuchszeit wird das Futter abgewogen, mit einer bestimmten Menge Wasser verrührt und den Tieren in geeigneten Tagesrationen verabfolgt. Die übrigbleibende Nahrungsmenge wird an der Luft getrocknet, gewogen und von der Gesamtmenge der dargereichten Nahrung abgezogen, wodurch



TABELLE 17.

	Analyseergebnis: $\gamma$ Bs (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen)			
Kaninchenserum mit 59,0 $\gamma$ Bs pro ml versetzt .....	78	63	62	53
Kaninchenserum allein .....	20	2	3	0
Differenz .....	58	61	59	53

zugesetzt wurde. Die Volumverhältnisse wurden so gewählt, dass die unvermeidliche Plasmaverdünnung höchstens 9 : 10 betrug.

Die Genauigkeit der Bestimmung von Bs in Plasma, Serum o. dgl. ist geringer als bei Bestimmung von Bs in reinen Lösungen. Im ersteren Falle findet man den Bs-Wert als das Ergebnis von vier Titrationen, im letzteren als das Ergebnis von zweien.

Wie auf S. 52 dargelegt wurde, wird die Bs-Bestimmung durch die Anwesenheit von Hexosediphosphat erheblich gestört. Normal kommt Hexosediphosphorsäure nicht in Plasma oder Serum, wohl aber in Blutkörperchen und Gewebsextrakten vor (Literatur siehe OPPENHEIMER 1939). Diesen störenden Faktor kann man ausschalten, indem man sich der spezifischen Hemmung bedient, welche die Malonsäure auf die Succinodihydrogenase ausübt (siehe S. 53). Aus Tabelle 14, S. 54 geht hervor, dass sich die hier angegebene Technik auch auf Plasma und Serum anwenden lässt. Die Bs-Menge der Probe wird aus dem Unterschied zwischen dem Ceriverbrauch der Probe ohne und der Probe mit Malonat berechnet. Dadurch vereinfacht sich die Berechnung, und vor allem findet man den Bs-Wert als das Ergebnis aus nur zwei Titrationen, statt aus vier, wie in der oben angegebenen Serum-Methodik. Teils aus diesem Grunde, teils auch weil schon minimale Mengen Hexosediphosphat die Bestimmung stören können, haben wir in der letzten Zeit durchweg bei der Bestimmung von Bs in Serum oder Plasma mit dieser „Malonatechnik“ gearbeitet.

Für Ausführung, Lösungen usw. verweise ich auf S. 63).

*Schaukelextraktion von Bs:* In gewissen Fällen empfiehlt es sich, vor der eigentlichen Bs-Analyse die Bs von im Analysenmaterial vorhandenen störenden Substanzen zu scheiden. Bisweilen kann dies notwendig sein, bevor die Probe z. B. der Oxydation mit Permanganat ausgesetzt wird. Am zweckmässigsten ist es, die angesäuerte Probe mit Äther zu extrahieren, wobei man Bs und die übrigen ätherlöslichen Säuren frei von sonstigen Stoffen erhält. Bei kleinen Mengen empfiehlt es sich, diese Extraktion mit Widmarks Schaukelextraktionsmethode auszuführen. (Siehe ausführlicher über Prinzip, Technik usw. bei WIDMARK (1933.)

## 1. Aufgenommene Nahrungsmenge.

Die von den Ratten verzehrte Nahrungsmenge, in g pro g Körpergewicht und Woche ausgedrückt, ist in Tabelle 31 angegeben. Ferner verzeichnet die Tabelle die Gewichtszunahme der Tiere während der Versuchsperiode.

TABELLE 31.

Kost	Menge d. aufgenommenen Nahrung in g pro g Körpergewicht und Woche	Gew.zunahme (g) während des Bilanzversuchs
1	0,44 ± 0,012	7 ± 1,7
2	0,39 ± 0,013	13 ± 3,8
3	0,44 ± 0,006	3 ± 1,1
4	0,56 ± 0,015	8 ± 2,0
5	0,55 ± 0,015	1 ± 2,5
6	0,54 ± 0,016	2 ± 2,6
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	1,03 ± 0,051	2 ± 2,6

Ein Zusatz von 2,1 % Faser zu Kost 1 (Kost 3) ändert nicht die Menge der verzehrten Nahrung pro g Körpergewicht. Die mit Kost 3 gefütterten Tiere sind indessen grösser als die mit Kost 1 gefütterten, weshalb sie absolut mehr fressen. Die Faserzufuhr in der hier angewandten Menge scheint also die Futteraufnahme anzuregen, was — wie der Wachstumsversuch gezeigt hat — ein schnelleres Wachstum zur Folge hatte. Während des Bilanzversuchs sind die mit Kost 1 gefütterten Tiere mindestens ebensogut gewachsen wie die Tiere, die Kost 3 erhielten, weshalb die Ausnützung der Nahrung in dem vorliegenden Falle von der Faserzufuhr unabhängig sein oder möglicherweise dadurch leicht verschlechtert werden dürfte.

Die mit Kost 2 (zusätzliches Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>) gefütterten Tiere fressen pro g Körpergewicht weniger als die mit Kost 1 und 3 gefütterten. Die Unterschiede sind 0,05 ± 0,018 g und 0,05 ± 0,013 g, also signifikant. Trotzdem haben die Tiere dasselbe Körpergewicht wie die mit Kost 3 gefütterten und wachsen während des Bilanzversuchs ebensogut wie die mit Kost 1, ein Resultat, das hier mit geringerer Kalorienzufuhr erreicht wird. Dieser Befund lässt sich kaum anders deuten, als dass die Vitamine der B-Gruppe (oder eins von ihnen) die Ausnützung der Nahrung fördern.

kann man leicht die Zeit berechnen, nach welcher die Hälfte der zugeetzten ätherlöslichen Säure extrahiert ist. Die Zeit der totalen Extraktion entspricht der zehnfachen sog. Halbierungszeit (siehe WIDMARK 1933). Ich habe für Bs-Lösungen und Heparinplasma mit Succinalzusatz die Halbierungszeit für meine verschiedenen Schaukelgefäße festgestellt. Die zur Totalextraktion benötigte Zeit ist nach dem Schaukelgefäß mit der niedrigsten Extraktionsgeschwindigkeit (d. h. mit der niedrigsten Extraktionskonstante) berechnet.

Extraktionsdauer für „totale“ Extraktion von Bs (99,9 %) aus wässriger Lösung von Bs: 3,5 Stunden. Heparinplasma mit Bs: 28 Stunden.

Schaukelgefäß, Mikromodell, nach WIDMARK (1933); Frequenz 12 Schaukelbewegungen pro Minute; Neigung 11°.

Der Schaukelextrakt lässt sich dann für weitere Manipulationen verwenden, z. B. Oxydation mit Kaliumpermanganat, Extraktion von Ketsäuren wie 2:4-Dinitrophenylhydrazonen usw.

Für Lösungen, Ausführung im einzelnen usw. verweise ich auf S. 65.

## Die verschiedenen Modifikationen der Bs-Bestimmung und ihre Anwendung.

### *Übersicht und Zusammenfassung.*

*Ursprüngliche Gestaltung der Bs-Bestimmung* (Prinzip S. 28, Ausführung S. 32): In dieser Gestalt wird die Methode für reine Succinatlösungen und in der Regel auch für Schaukelextrakte aus Plasma, Serum und Harn verwendet.

*Technik 1* (Prinzip S. 58, Ausführung S. 63): Wenn eine Analysenprobe Substanzen enthält, die nicht-enzymatisch durch Ferricyanid oder Cerisulphat oxydiert werden, d. h. wenn die Probe eine Spontanreduktion hat, muss man eine Korrektur einfügen. Dies gilt u. a. von Plasma und Serum.

*Technik 2* (Prinzip S. 53, Ausführung S. 64): Gewisse Enzyme („Saisonvariation“, siehe S. 39) liefern richtige Werte nur mit der „Malonatechnik“, d. h. Technik 2. Diese ist auch anzuwenden, wenn die Probe Hexosediphosphat enthält. Zeigt die Probe Spontanreduktion, so ist es bequemer und besser, konsequent Technik 2 statt Technik 1 zu verwenden.

*Technik 3* (Prinzip S. 54, Ausführung S. 64): Diese Technik kommt zur Anwendung, wenn das Analysenmaterial  $\alpha$ -Ketoglutarsäure enthält. Da es in der Regel ungewiss ist, ob Plasma- oder Serumproben diese Säure enthalten, und da Technik 3 umständlich und zeitraubend ist, habe ich es vorgezogen, in unsicheren Fällen mit Technik 2 zu arbeiten. Bs-Bestimmung nach Technik 3 wird nur in einer kleineren Zahl von Proben

Die Menge der Faeces verändert sich nicht bei erhöhtem Vitamin-B-Gehalt der Nahrung; sowohl bei Fütterung mit Kost 1 als mit Kost 2 werden 4,6 % Fäkalien ausgeschieden. Ein Zusatz von Zellulose zur Kost steigert bekanntlich die Menge der Faeces. Die mit Kost 3 gefütterten Tiere geben eine grössere Menge ab, als die mit Kost 1 gefütterten. Die Gewichtszunahme der Fäkalien —  $2,5 \pm 0,20$  % — ist etwas grösser, als es der mit Kost 3 zugeführten Fasermenge entspricht. Dies kann entweder darauf beruhen, dass die Fasern eine verschlechterte Resorption der Kost verschulden, oder eher darauf, dass sie die Absonderung von Darmsekret, das dann nicht wieder resorbiert wird, anregen.

Bei Fütterung mit Kost 4 (35 % Weizenkleie enthaltend) nimmt die Menge der Faeces stark zu. Diese Kost enthält 3,5 % Rohfaser. Vergleicht man die bei Fütterung mit Kost 3 und Kost 4 ausgeschiedene Kotmenge, so findet man bei letzterer eine Steigerung um  $10,1 \pm 0,48$  %. Diese Zunahme der Kotmenge erscheint unverhältnismässig gross, wenn man sie mit der Zunahme bei Kost 3 im Verhältnis zu Kost 1 vergleicht (siehe oben). Die nächstliegende Erklärung hierfür ist wohl die, dass von der Weizenkleie nur ein kleinerer Teil resorbiert wird. Verursacht dürfte dies sein durch die Schwerverdaulichkeit der Kleie, begünstigt noch durch eine beschleunigte Darmpassage. Indessen gibt es noch eine zweite Möglichkeit. Die Zellulose der Kost 3 besteht aus feinen Fasern, die den Darmkanal passieren dürften, ohne viel Platz zu benötigen und ohne die Darmsehleimhaut stärker zu reizen. Die Kleiezellulose dagegen baut die Wandungen der Kleiezellen auf. Sie liegt also in Konglomeraten von würfelförmigen Bildungen vor, wo die Wandung jedes Würfels aus Zellulose besteht. Die Zellulose der Kleie nimmt deshalb grösseren Platz ein und dürfte den Darmkanal reizen können, was eine gesteigerte Darmsekretion im Gefolge hat. Es liegt also die Möglichkeit vor, dass die bei der Kleiekost festgestellte grössere Fäkalienmenge nicht auf die Schwerverdaulichkeit der Kleie, sondern, gänzlich oder zum Teil, auf eine verstärkte Darmsekretion zurückzuführen ist.

Bei Fütterung mit Kost 5 wird eine wenig grössere Menge Fäkalien ausgeschieden, als bei Fütterung mit Kost 4. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Backt man dagegen die ganze Kostmischung (Kost 6), so nimmt die Kotmenge zu. Bei Kost 6 werden  $4,2 \pm 0,52$  % mehr Fäkalien ausgeschieden als bei Kost 4. Der Unterschied ist statistisch gesichert. Eine gebackene Kost

Crriverbrauch bei Titerstellung: 2,050 (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

Faktor:  $\frac{2}{2,050} \cdot 103,33 = 100,7$ .

Spontanreduktion der Probe (Röhrchen 2): 1,100 ml Ceriumsulfatlösung

> des Enzyms( > 3): 0,840

Zusammen 2,000

minus Indikatorwert ( > 4): 0,360

Korrigierter Kontrollwert : 1,640

Gesamtreduktion (Röhrchen 1): 1,685

minus korrigierter Kontrollwert 1): 1,640

Der Bs-Menge der Probe entsprechend : 0,045

Ergebnis: Die Probe enthält  $0,045 \cdot 100,7 = 5 \gamma$  Bs.

**Technik 2:** Reagenzien und Lösungen: 0,10-mol. Stamm-Malonatlösung: 0,5200 g Acidum malon. (Merck) + 10,0 ml 1,0-n Natronlauge, Aqua redest. ad 50 ml.

Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung mit Malonat: 20 ml 0,05-mol. Stamm-Ferricyanidlösung + 10 ml 2:6-Dichlorophenolindophenollösung 1:2000 + 10 ml 0,1-mol. Stamm-Malonatlösung werden mit M/15 Phosphat pH 7,38 ad 100 ml versetzt.

Sonstige Lösungen und Bereitung der genannten Stammlösungen siehe S. 30.

Die Ausführung geht aus folgendem Beispiel hervor:

Röhrchen Nr.	1	2
Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung .....	1,0 ml	—
Ferricyanid-Farbstoff-Puffer-Lösung mit Malonat —	—	1,0 ml
Plasma (Analysenprobe) .....	1,0	1,0
Enzym .....	0,5	0,5
Trichloressigsäure, 35 % .....	1,0	1,0

Crriverbrauch : 0,910 ml 0,375 ml

Differenz zwischen Röhrchen 1 und Röhrchen 2: 0,035 ml

(der Bs-Menge in der Probe entsprechend)

Crriverbrauch bei Titerstellung : 1,975 ml (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

Zur Berechnung wird derselbe Faktor verwendet wie bei Technik 2, S. 63.

$\frac{2}{1,975} \cdot 103,33 = 104,6$ .

Ergebnis: Die Probe enthält  $0,035 \cdot 104,6 = 4 \gamma$  Bs.

**Technik 3:** Reagenzien und Lösungen: 2:4-Dinitrophenylhydrazinlösung: 0,050 g 2:4-Dinitrophenylhydrazin (Schuchardt) + 10 ml 6-n Schwefelsäure (aus 18-n bereitet). Die Lösung wird täglich frisch bereitet.

### 3. Die Resorption der Weizenkleie.

Bei Fütterung mit Kost 1 wird eine Kotmenge ausgeschieden, die 4,6 % der aufgenommenen Futtermenge entspricht, bei Fütterung mit Kost 3 7,1 %. In Kost 3 müssen also 97,9 % von Kost 1  $\frac{4,6 \times 97,9}{100} = 4,5$  % ausscheiden. Die in Kost 3 durch die Zellulose-

faser bewirkte Kotmenge ist demnach  $7,1\% - 4,5\% = 2,6\%$ . Wird die Zellulose als unresorbiert vorausgesetzt, so machen Reste des Darmsekrets  $2,6\% - 2,1\% = 0,5\%$  aus. Betrüge die Zellulose 10 % der Kost, statt 2,1 %, so wäre die Steigerung der Kotmenge  $\frac{10 \times 0,5}{2,1} = 2,4$  % der aufgenommenen Futtermenge.

In Weizenkleie mit 1 % Fischlebertran, wo die Menge der Rohfaser 10 % ausmacht, sollte die Zellulose eine gesteigerte Ausscheidung von Sekretresten = 2,4 % bewirken. Es werden indessen 43,5 % der aufgenommenen Futtermenge ausgeschieden. Also würden die unresorbierten Bestandteile der Weizenkleie  $43,5\% - 2,4\% = 41,1\%$  ausmachen.

Die unresorbierte Weizenkleie lässt sich auch von Kost 4 aus berechnen. Macht der Zellulosegehalt einer Kost 3,5 % statt 2,1 % aus, so muss die Vermehrung der Sekretreste in den Faeces durch

die Zellulose  $\frac{3,5 \times 0,5}{2,1} = 0,8\%$  betragen. Bei Kost 4 würde also

die Kotmenge  $4,6\% + 0,8\% = 5,4\%$  der aufgenommenen Futtermenge sein. Die bei Kost 4 erhaltene Kotmenge belief sich indessen auf 17,2 % der Futtermenge. Die 35 % Weizenkleie der Kost 4 verursachten also eine weitere Zunahme der Fäkalien =  $17,2\%$

$- 5,4\% = 11,8\%$ . Unresorbierte Weizenkleie somit  $\frac{100 \times 11,8}{35} = 33,7\%$ .

Die Weizenkleie würde also laut Berechnung zu etwa 60 % resorbiert, wobei jedoch angenommen wurde, dass die Zellulose der Weizenkleie dieselbe Menge Darmausscheidung bewirkt, wie die entsprechende Menge der Zellulose in Kost 3. Doch muss man, wie schon gesagt, annehmen, dass die Kleiezellulose die Darmsekretion stärker anregt als die Faserzellulose. Die oben angegebenen 40 % würden in grösserem Ausmass aus Sekretresten bestehen können, es würde also mehr als 60 % der unbehandelten Kleie resorbiert werden können.

	Dizipient	Rezipient
Analysenprobe <sup>1</sup> .....	3,0 ml	—
0,2-n Schwefelsäure, 16 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> enthaltend ..	1,5	—
0,10-n NaOH .....	—	2,5 ml
Äthyläther wie oben .....		37 ml

Nach Abschluss der Extraktion wird der Inhalt des Rezipienten quantitativ in ein flachbodiges Titrierglas (Modell siehe S. 32) gebracht. Die Lösung wird mit 1 Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt, und die Rotfärbung garantiert, dass im Rezipienten ein Überschuss von NaOH vorhanden war. Dann versetzt man mit 2,5 ml 0,10-n HCl und titriert mit 0,10-n NaOH, bis eine leichte Rosafärbung eintritt. Dadurch erfährt man die Gesamtmenge an ätherlöslichen Säuren in der Probe.

Bei sehr hohem Bs-Gehalt der Analysenprobe, wie er bisweilen in Harn vorkommt, wird diese Titration statt dessen in einem 10 ml grossen Messkolben ausgeführt, worauf man bis zur Marke mit Aqua redest. verdünnt und die Bs-Analyse dann in dieser verdünnten Lösung vornimmt.

Bei Extraktion von Plasma, Serum und Harn mit mässig erhöhtem oder normalem Bs-Gehalt empfiehlt es sich, die Probe im Trockenschrank völlig einzudampfen. Nach dem Abkühlen wird die Probe in einer bestimmten Menge Aqua redest. gelöst und die Bs-Bestimmung an dieser Lösung vorgenommen. Dabei ergibt sich ein kleiner Verdünnungsfehler, der indessen für die Genauigkeit der weiteren Analyse keine Rolle spielt. In der endgültigen Analysenprobe ergibt sich auf diese Weise eine höhere Bs-Konzentration, als wenn man den Schaukelextrakt nach der Titration auf ein bekanntes Volumen verdünnt und dann die Bs analysiert. Dies ist ein grosser Vorteil, wenn die Bs-Konzentration der ursprünglichen Probe sehr niedrig ist (z. B. Plasma und Serum).

In der Regel zeigt Schaukelextrakt von Plasma und Serum keine „Spontanreduktion“. Man versetzt deshalb die eingedampfte Probe zweckmässig mit 2,5 ml Aqua redest., so dass man 2 ml für 2 Bs-Bestimmungen abpipettieren kann. Will man feststellen, ob die Probe Spontanreduktion zeigt, so muss man die Probe in 4,5 ml statt in 2 ml Aqua redest. auflösen, damit man 4 ml zur Doppelbestimmung erhält. Dabei arbeitet man mit Technik 1 oder noch besser mit Technik 2.

Enthält die Probe  $\alpha$ -Ketoglutar säure oder Malonsäure, so wird der Schaukelextrakt mit Technik 3 bzw. Technik 4 behandelt.

Berechnung: Der Schaukelextrakt wird bis zur Trockenheit eingedampft und in 2,5 ml Aqua redest. gelöst. Von dieser Lösung pipettiert man 1 ml für eine Bs-Bestimmung ab (zweckmässig macht man Doppelbestimmungen). Den dabei erhaltenen Bs-Wert nennen wir B<sub>7</sub>. In der ganzen Menge Schaukelextrakt findet sich also B<sub>7</sub> 2,5 7 Bs. Diese Menge ist aus

<sup>1</sup> Ist die Probe eiweiss haltig (Serum, Plasma), so bildet sich ein Niederschlag. Um vollständige Extraktion zu erzielen, empfiehlt es sich, den Niederschlag von Zeit zu Zeit umzurühren.

Werten wird errechnet, wie viel Stickstoff mit den Faeces ausgeschieden wird und wie viel im Organismus verbleibt (Tab. 33 und 34). Die kleinen Stickstoffverluste, die durch Haarausfall entstehen können, werden vernachlässigt.

TABELLE 33.

Kost	Mit den Faeces ausgeschiedener Stickstoff in % der aufgenommenen Menge
1	10,3 ± 0,52
2	9,5 ± 0,24
3	10,9 ± 0,56
4	19,2 ± 0,88
5	23,4 ± 0,91
6	30,2 ± 0,88
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	42,9 ± 2,46

a. *Mit den Faeces ausgeschiedene Stickstoffmenge.*

Die Stickstoffausscheidung mit den Faeces ist in Prozent der aufgenommenen Stickstoffmenge angegeben. Wir finden, dass zusätzliches Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (Kost 2) die Menge des Fäkalstickstoffs etwas verringert, während ein Zusatz von 2,1% Faser (Kost 3) diese Menge etwas steigert. Der Unterschied ist indessen in keinem Falle signifikant. Eine wirklich signifikante Differenz besteht jedoch zwischen den bei Kost 2 und Kost 3 gefundenen Werten und bestätigt die Richtigkeit der oben wiedergegebenen Beobachtung (Signifikanz =  $1,4 \pm 0,61\%$ ).

Wird die Kost mit 35% Weizenkleie versetzt (Kost 4), so nimmt der Fäkalstickstoff stark zu. Die Menge des Stickstoffs im Kot wird noch mehr gesteigert, wenn geröstete Weizenkleie (Kost 5) gefüttert wird. Der Unterschied —  $4,2 \pm 1,27\%$  — ist statistisch gesichert. Durch Backen der Kleiekost (Kost 6) erhöht sich der Stickstoffverlust mit den Faeces noch mehr, als wenn nur die Kleie erhitzt wird.

Backen der Kost oder Rösten der Weizenkleie bewirkt also einen sicher erhöhten Verlust an Stickstoffprodukten durch die Faeces. Die Erklärung dürfte darin zu suchen sein, dass die Verdaulichkeit der Eiweißstoffe unter der Wärmebehandlung leidet und dass die Röstprodukte eine verstärkte Absonderung von Darmsaft verursachen, welcher Darmsaft zum Teil mit den



### KAPITEL III.

## Die Hemmung der Bs-Dehydrierung und der Fumarsäure-Hydrierung durch Malonsäure.

Um die Rolle der Bs und der Succinodehydrogenase im intermediären Stoffwechsel näher zu erforschen, ist es wichtig, die Wirkung zu studieren, die sich bei einer spezifischen Hemmung dieses Enzyms *in vitro* und *in vivo* einstellt. Auf die Lösung dieses Problems ist viel Mühe verwandt worden. — Drei Stoffe hemmen bereits in sehr schwachen Konzentrationen die Succinodehydrogenase: Malonsäure, Pyrophosphorsäure (LELOIR u. DIXON 1937) und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (WEIL-MALHERBE 1937, eigene unveröffentlichte Versuche). Die Hemmung der Succinodehydrogenase durch die Pyrophosphorsäure ist nicht spezifisch (siehe HOFF-JÖRGENSEN 1940). Die Hemmung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ist nur wenig untersucht. Die hemmende Wirkung der Malonsäure auf die Succinodehydrogenase dagegen ist bei Umsetzungsversuchen *in vitro* weitgehend gebraucht worden. In der Erörterung der  $C_4$ -Säurentheorie, des Citronensäurezyklus und verwandter Probleme nehmen die Malonatversuche eine zentrale Stellung ein.

Die hemmende Wirkung des Malonats auf die Bs-Dehydrierung wurde erstmalig von QUASTEL und seinen Mitarbeitern festgestellt (QUASTEL 1926, QUASTEL u. WOOLDRIDGE 1928). Sie betrachteten die Hemmung als spezifisch für die Succinodehydrogenase und führten sie auf die Konstitutionsähnlichkeit der genannten Säure mit Bs zurück. Die Malonsäure wird wegen dieser Ähnlichkeit mit grosser Affinität an das Enzym adsorbiert und verdrängt so Bs von der verfügbaren Enzymoberfläche. Da das Malonat nicht umgesetzt wird, ergibt sich hierdurch eine starke Hemmung der Bs-Dehydrierung. SZENT-GYÖRGYI schliesst sich dieser Ansicht, dass Malonat die Succinodehydrogenase *spezifisch* hemme, an. WEIL-MALHERBE (1937) dagegen ist der Ansicht, dass die Malonathemmung nicht ganz spezifisch für das genannte Enzym ist. Gegenüber den Arbeiten dieses und anderer Forscher, in denen Malonathemmung auch bei anderen Dehydrie-

b. *Im Organismus verbleibender Stickstoff.*

Die Stickstoffretention der Versuchstiere ist teils in Prozent der aufgenommenen Stickstoffmenge ausgedrückt worden, teils als während der Versuchsdauer (4 Wochen) im Organismus retinierte Stickstoffmenge in Gramm (Tab. 34).

TABELLE 34.

Kost	Im Organismus ver- bliebener Stickstoff in % der aufgenommenen Menge	Durchschnittlich pro Tier während des Bilanzversuchs im Organismus verbliebene N-Menge (g)
1	13,6 ± 1,89	1,5 ± 0,21
2	13,1 ± 1,62	1,5 ± 0,23
3	21,1 ± 1,64	2,3 ± 0,30
4	16,5 ± 2,80	2,6 ± 0,34
5	15,5 ± 2,29	2,3 ± 0,31
6	8,0 ± 1,76	1,0 ± 0,18
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	30,9 ± 2,47	4,0 ± 0,32

Vergleicht man die im Organismus verbliebene Stickstoffmenge mit dem Wachstum der Tiere während des Bilanzversuches (Tab. 31), so überrascht die Grösse der Stickstoffmenge. Sie dürfte sich nur damit erklären lassen, dass die Tiere Fett und Kohlehydrat aus dem Organismus zur Verbrennung verbrauchen, während die zugeführten Stickstoffprodukte körpereigene Stoffe aufbauen.

Die Retention des Stickstoffs im Organismus hängt von mehreren Faktoren ab. Sie wird u. a. beeinflusst durch:

- 1) die Art des zugeführten Stickstoffs,
- 2) das Wachstum des Versuchstieres,
- 3) den Eiweissgehalt der Zellen (RUBNER, 1908).

Eine richtige Bewertung der hier erhaltenen Resultate bietet deshalb grosse Schwierigkeiten.

Die Kostmischungen 1, 2 und 3 enthalten dieselben Stickstoffprodukte in gleicher Proportion. Die mit Kost 1 und 2 gefütterten Tiere retinieren eine sowohl prozentual als absolut gleich grosse Menge Stickstoff. Ihr Wachstum während des Bilanzversuches ist gleich gut. Im Wachstumsversuch zeigen indessen die Tiere, die zusätzliches Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (Kost 2) bekommen, ein besseres Wachstum. Sie sind also grösser als die mit Kost 1 gefütterten Tiere, behalten aber trotzdem nicht mehr

selbe ist, sondern nur so viel zugesetzt wird, dass der Farbstoff „etwas überreduziert“ wird.

Die Oxydation der Bs zu Fumarsäure durch die Succinodehydrogenase ist eine reversible Reaktion (J. LEHMANN 1930). Einer der Mitarbeiter Szent-Györgyis (K. LAKI 1935, S. 33) hat gezeigt, dass Bs und Fumarsäure gleich grosse Affinität für dieses Enzym besitzen. Dann ist es theoretisch unwahrscheinlich, dass die Malonathemmung stärker ist, wenn die Reaktion in der einen Richtung abläuft, als wenn sie in der entgegengesetzten Richtung erfolgt. Hierauf weist auch OPPENHEIMER (1939) in seiner Kritik der Szent-Györgyischen Theorie hin.

Es wäre daher sehr wünschenswert, wenn man experimentell mit einer zufriedenstellenden Methodik entscheiden könnte, ob die Malonsäure die Bs-Dehydrierung und die Fumarsäure-Hydrierung im gleichen Grade hemmt oder nicht. Diesbezügliche Versuche werden nachstehend geschildert.

*Methodik:* Will man die quantitativen Verhältnisse bei Hemmung einer reversiblen Reaktion untersuchen, so müssen die Versuchsbedingungen bei dem Ablauf der Reaktion in beiden Richtungen möglichst dieselben sein. Untersucht man die Dehydrierung von Bs mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor, so muss die Hydrierung von Fumarsäure mit Leukomethylenblau als Wasserstoffdonator geschehen. Im übrigen sollen die Versuchsbedingungen, die Konzentration der an der Reaktion teilnehmenden Stoffe, der pH usw. identisch sein. Wenn man unter diesen Verhältnissen für die beiden Reaktionen die prozentuale Hemmung bestimmt, die eine geeignete, in Vorversuchen ausprobierte Malonatkonzentration hervorruft, so wird man berechtigt sein können, die Ergebnisse in beiden Fällen miteinander zu vergleichen. Unter diesen Versuchsbedingungen verschiebt sich das Redoxpotential des Systems bei beiden Reaktionen genau längs derselben Kurve.

Die exakteste Methode, den Reaktionsablauf bei der Dehydrierung der Bs zu verfolgen, dürfte es sein, durch Redoxpotentialmessungen die Verschiebung dieses Potentials mit fortschreitender Reaktion zu verfolgen. Um die Hydrierung von Fumarsäure zu untersuchen, lässt man die gleiche Menge Methylenblau wie im vorigen Falle durch eine kleine Menge Bs zu Leukomethylenblau dehydrieren. Dann versetzt man mit Fumarsäure, und durch Potentialmessungen folgt man den Reaktionsablauf der Hydrierung.

Wenn sowohl die Dehydrierung als die Hydrierung untersucht werden soll, empfiehlt es sich, als Wasserstoffacceptor (bzw. Wasserstoffdonator) und Potentialvermittler einen Redoxindikator zu benutzen, dessen Potential dem des Succinat-Fumarat-Systems möglichst nahe kommt. Methylenblau ist für diesen Zweck am geeignetsten. Wird das Redoxpotential ( $E_0'$ )

dürften also einen relativ kleineren Bedarf an Stickstoffprodukten haben, als die kleineren. Die in Kost 5 enthaltenen Stickstoffprodukte dürften somit schlechter ausgenutzt worden sein, als die in Kost 4. Erhitzung der Weizenkleie auf  $170^{\circ}$  verschlechtert also die Ausnützbarkeit des Stickstoffs.

Bei Fütterung mit der gebackenen Kost (Kost 6) zeigen die Tiere im Verhältnis zu denen mit Kost 5 keinen sicheren Unterschied im Wachstum während der Wachstums- und Bilanzversuche. Sie behalten absolut und prozentual eine kleinere Menge Stickstoff im Organismus zurück. Dies könnte evtl. an der grösseren Menge Fäkalstickstoff bei der gebackenen Kost liegen. Betrachtet man indessen die Werte, die sich bei dem Versuch mit Weizenkleie + 1% Fischlebertran ergeben, so findet man, dass ein hoher Stickstoffverlust mit den Faeces sehr wohl mit hoher Stickstoffretention vereinbar ist.

Die mit Weizenkleie + 1% Fischlebertran gefütterten Ratten wachsen während des Wachstumsversuches schlechter als alle mit den übrigen Mischungen gefütterten. Während des Bilanzversuches ist die Gewichtszunahme geringer als die der übrigen Tiere oder gleich derselben. Die Stickstoffretention ist für diese Tiere absolut und prozentual am grössten. Die Kost unterscheidet sich jedoch erheblich von der Zusammensetzung der übrigen Futtermischungen, und die Wachstumskurve weicht auch stark von derjenigen der übrigen Gruppen ab. Ein Vergleich in bezug auf die Ausnützung der Stickstoffprodukte dürfte sich hier nicht durchführen lassen.

Zufuhr von Vitamin  $B_1$  und  $B_2$  scheint die Ausnützung der Stickstoffprodukte erleichtern zu können. Erhitzung auf  $170^{\circ}$  verschlechtert die Ausnützung der Stickstoffprodukte. Vitamin  $B_1$  wird bei einstündiger Erhitzung auf  $170^{\circ}$  zum Teil zerstört (siehe S. 83 ff.). Die schlechtere Ausnützung des Stickstoffs nach Erhitzung der Weizenkleie dürfte sich also zum Teil durch den geringeren Vitamin- $B_1$ -Gehalt der Kost erklären lassen. Wahrscheinlich wirkt jedoch die Erhitzung auch direkt auf die Eiweissstoffe ein, so dass diese sich weniger gut als Bausteine im tierischen Organismus eignen.

### Zusammenfassung.

Die Bilanzversuche an Ratten haben in bezug auf den Stickstoffumsatz ergeben:

Unterschied zwischen dem  $E'$ , der beiden Systeme beträgt bei diesen pH nur 0,005 bzw. 0,010 Volt. Durch Vorversuche im Thunbergversuch wird die Malonatmenge ermittelt, welche die Dehydrierung zu etwa 50 % hemmt. Dieser Hemmungsgrad dürfte am geeignetsten sein. Man erzielt damit eine Wirkung, die mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Methode genügend stark ist. Mit stärkerer Hemmung zu arbeiten, ist nicht ratsam, da die Reaktionszeit dadurch so in die Länge gezogen werden kann, dass das Enzym sich irreversibel verändern kann.

Die Succinodehydrogenase muss selbstverständlich frei von Fumarase sein, wenn man richtige Potentiale erhalten will. Die Enzymlösung wurde aus Schweineherz nach einer Modifikation der Lehmannschen Methode (LEHMANN 1940, LEHMANN u. HOFF-JÖRGENSEN 1939) dargestellt.

Die Enzymlösung wird vor dem Versuch mit Hilfe von HCl oder NaOH auf den gewünschten pH gebracht.

Damit man genügend viele Potentialmessungen ausführen kann, darf die Reaktionsgeschwindigkeit nicht zu hoch sein. Im Methylenblauversuch wird durch Änderung der Enzymmenge eine passende Entfärbungszeit, etwa 15 Min., gefunden. Die Methylenblau-Menge (100  $\gamma$ ) ist nach LEHMANN (1940) gewählt.

Im Vorversuch zeigte sich, dass 0,4 ml der angewandten Enzymlösung eine passende Reaktionszeit gibt und dass ein Zusatz von 0,2 ml 0,01-molarer Malonatlösung eine etwa 50 %ige Hemmung bewirkt. Das totale Reaktionsvolumen beträgt 3,0 ml.

Zur Technik der Redoxpotentialmessung siehe LEHMANN (1940).

Für die Redoxpotentialmessungen wurden Redoxgefäße nach LEHMANN (1940) benutzt, mit einem Annex zur Einfüllung der Lösungen, die erst nach der Evakuierung zugesetzt werden sollen. In das Gefäß selbst werden Phosphatpuffer, Enzym und evtl. Malonat gebracht. Mit der Ölpumpe wird dann 5 Minuten lang evakuiert, die letzten 2 Minuten wird das ganze Redoxgefäß ins Wasserbad getaucht. Dann wird unter vorsichtigen Umrühren das im Annex befindliche Methylenblau und Succinat zugegossen. Der Augenblick des Zugießens bezeichnet den Beginn der Reaktion. Das Element, dessen EMK nun gemessen wird, besteht einerseits aus Enzym-Succinat-Methylenblau im Redoxgefäß und blanker Pt-Elektrode, andererseits aus einem Röhrchen mit Veibel-Lösung und Chinhydron und blanker Pt-Elektrode. Diese beiden Halbelemente werden durch eine Brücke von Kaolin-Agar verbunden (LEHMANN 1930). Das Röhrchen mit Chinhydron-Veibel muss gut verschlossen sein, da sonst wegen der Flüchtigkeit des Chinons das Redoxgleichgewicht gestört werden kann.

Bei der Fumaräthydrierung wird das Leukomethylenblau in der Weise dargestellt, dass dieselbe Menge Methylenblau wie in den Bs-Dehydrierungsversuchen mittels der kleinstmöglichen Menge Succinat entfärbt wird. Nachdem die Reaktion, deren Verlauf durch Messung des Redoxpotentials verfolgt wird, zum Stillstand gekommen ist, wird das Fumarat zugesetzt. Bei Hemmungsversuchen wird das Malonat nach eingetretener Entfärbung zugegossen und die Fumarsäure erst nach weiteren 5 Min. zugesetzt. In

sium sind vor allem gewisse Teile des Zentralnervensystems, die Muskeln und die Nieren (ARON und GRALKA, 1926). Die Rolle, die das Magnesium im Organismus spielt, ist noch wenig klargelegt. Man weiss indessen, dass das Mineral für etliche enzymatische Reaktionen, z. B. für Phosphorylierung, notwendig ist (ALBERS, 1940). Im übrigen haben zweifellos die beiden Minerale, besonders das Magnesium, mehrere noch unbekannte Aufgaben.

#### a. Der Calcium- und Magnesiumverlust mit den Faeces.

Nach NICOLAYSEN (1934, 1936) soll keine Calcium- oder Magnesiumausscheidung durch das Colon stattfinden. Was man von diesen Mineralen in den Faeces wiederfindet, sind unresorbierte und mit den Sekreten abgesonderte Mengen. Diese Ansicht steht im Widerspruch zu älteren, laut denen besonders Calcium-, teilweise aber auch Magnesiumexkretion durch das Colon erfolgen soll (siehe z. B. STRASBURGER, 1929). Der Verlust endogenen Calciums mit den Faeces kann jedoch hochgradig verschieden sein. Nach der einen Ansicht beruht dies auf den wechselnden in den Darmsekreten enthaltenen Mengen, nach der anderen auf verschieden starker Exkretion durch das Colon.

Der Calcium- und Magnesiumverlust mit den Fäkalien bei den Bilanzversuchen, ausgedrückt in Prozent der von diesen Stoffen aufgenommenen Mengen, ist in Tabelle 35 angegeben.

TABELLE 35.

Kost	Mit den Faeces ausgeschiedenes Calcium in % der aufgenommenen Menge	Mit den Faeces ausgeschiedenes Magnesium in % der aufgenommenen Menge
1	86,4 ± 2,80	64,7 ± 3,61
2	81,9 ± 2,18	73,5 ± 3,56
3	90,0 ± 2,35	79,1 ± 4,22
4	83,4 ± 2,23	75,5 ± 0,75
5	89,4 ± 2,66	87,3 ± 5,63
6	92,7 ± 1,39	96,4 ± 5,20
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	97,0 ± 4,12	103,2 ± 4,74

Betrachten wir zunächst die bei Fütterung mit Kost 1 bzw. 2 und 3 erhaltenen Werte, so findet man, dass die Calciumwerte den oben besprochenen Stickstoffwerten gleichlaufen. Das Mittel des prozentualen Calciumverlustes steigt an, wenn der Kost 2,1%

TABELLE 20.  
Fumarsäure-Hydrierung.

Rohr Nr. 3		Rohr Nr. 4	
Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden	Potential in Volt	Zeit nach dem Anfang der Reaktion Minuten u. Sekunden
0,594	0.00	0,593	0.00
0,584	0.27	0,579	1.00
0,579	0.58	0,572	2.57
0,572	1.45	0,565	5.27
0,565	2.54	0,561	7.45
0,561	4.00	0,556	9,54 (?)
0,558	5.45	0,555	10.30
0,550	9.33	0,550	15.54
pH nach dem Versuch 7,18		pH nach dem Versuch 7,18	

Die Redoxpotentialmessungen wurden in der Weise angeführt, dass ich die Zeiten bestimmte, wo das Potential des Systems einer Reduktion des Methylenblaus von etwa 30 %, 40 %, 50 % usw. entsprach. Tabelle 19 u. 20 zeigen die Ergebnisse dieser Potentialmessungen.

Berechnung:  $E_0$  des Chinhydrons 0,6901 Volt. pH der Veibel-Lösung 2,04.

Bei 37° ist das  $E_0'$  des Chinhydron-Veibel-Halbelements 0,6901 — 0,0615 = 0,6286 Volt.

Nach Fig. 3 S. 71 ist das  $E_0'$  des Methylenblau/Leukomethylenblau bei pH 7,02 = 0,003 Volt, bei pH 7,18 = 0,000 Volt.

Bei 50 %iger Oxydation ist also das Potential bei einem pH von 7,02 0,565 — 0,003 = 0,562 Volt, bei pH 7,18 0,563 — 0,000 = 0,563 Volt.

Von diesen beiden Potentialen ausgehend, berechnet man mit Hilfe von Tabelle 1, S. 15, LEHMANN (1930) die Potentiale der verschiedenen Redox-Quoten Fig. 4, S. 75. Mit Hilfe der obigen Kurve wird der Prozentsatz der Oxydation für die abgelesenen Potentiale ermittelt.

Für die endgültige Berechnung wird nur der Teil der Kurve verwendet, der in der Hauptsache geradlinig verläuft. Dies u. a. deshalb, weil bei mehr waagerechtem Kurvenverlauf die Fehler der aus der Kurve erhaltenen Zeiten relativ grösser sind.

Verlängert man die Kurve über ihren Anfang hinaus, so geht diese Linie nicht durch die Origo. Es vergeht also eine gewisse Latenzzeit, bis die Reaktion ihre volle Geschwindigkeit erreicht hat. Den Grund dessen kennen wir nicht. Möglicherweise vergeht eine kurze Zeit, ehe die Bs an das Enzym adsorbiert ist.

Zur Berechnung wird nur die Kurvenstrecke beispielsweise zwischen 20 %iger Reduktion und 50 %iger Reduktion ausgewertet, denn bei der Fs-Hydrierung beginnt der Versuch bei etwa 80 %iger Reduktion. Da-

Vergleicht man den prozentualen Calciumverlust bei Kost 4 mit dem bei Kost 1, 2 und 3, so findet man keine Zunahme des Verlustes im Verhältnis zu Kost 1 und 2, wohl aber eine Abnahme — Differenz =  $6,6 \pm 3,24\%$  — im Verhältnis zu Kost 3. Da Kost 3 weniger Faser enthält als Kost 4, wäre das Umgekehrte zu erwarten gewesen. Mit der Weizenkleie wird der Kost indessen eine grössere Menge Vitamin  $B_1$  und  $B_2$  zugeführt. Ist die weiter oben als wahrscheinlich bezeichnete Annahme richtig, dass diese Vitamine die Menge des Fäkalcalciums herabsetzen, so erklärt sich damit die bei Kost 4 gefundene Menge Fäkalcalcium im Vergleich zu Kost 3. Dass Vitamin  $B_1$  und  $B_2$  — oder eines von ihnen — die prozentuale Menge des Fäkalcalciums senken, bestätigen die oben nachgewiesenen Differenzen. Die hier angeführten Werte zeigen auch, dass 35% Weizenkleie in einer Kost den Calciumverlust mit den Faeces nicht erhöht.

Bei einem entsprechenden Vergleich der bei den Kostmischungen 1—4 erhaltenen Magnesiumwerte findet man eine sichere Zunahme des Fäkalmagnesiums —  $10,8 \pm 3,69\%$  — wenn die Kost mit 35% Weizenkleie versetzt wird. Dagegen ergibt sich kein Unterschied zwischen der prozentualen mit den Faeces ausgeschiedenen Magnesiummenge bei Kost 3 und derjenigen bei Kost 4. Mit Weizenkleie zugeführtes Magnesium veranlasst also keinen grösseren Verlust mit den Faeces als die entsprechende Menge Magnesiumoxyd bei einer faserhaltigen Kost. Die Zunahme des Fäkalmagnesiums bei Kost 4 im Vergleich zu Kost 1 dürfte also durch die Zellulose der Weizenkleie bedingt sein und nicht daran liegen, dass die Auslösung des Magnesiums aus den Weizenkleiezellen erschwert wäre.

#### b. *Im Organismus verbleibendes Calcium und Magnesium.*

Mit dem Harn werden bei diesen Versuchen prozentual ziemlich kleine Mengen Calcium und Magnesium ausgeschieden. Die Calciumausscheidung im Harn ist  $\leq 5\%$  der aufgenommenen Menge, die Magnesiumausscheidung  $\leq 10\%$ . Die Calciummenge, ausgedrückt in Prozent der aufgenommenen Futtermenge, ist bei den Kostmischungen 1—6 praktisch dieselbe. Infolgedessen wird die prozentual im Organismus verbleibende Calciummenge im umgekehrten Verhältnis zu den Fäkalcalciumwerten wechseln. Entsprechendes gilt für den Magnesiumstoffwechsel. Wenn eine grössere Menge dieser Minerale mit den Faeces ausgeschieden wird, regelt der tierische Organismus den Stoffwechsel so, dass



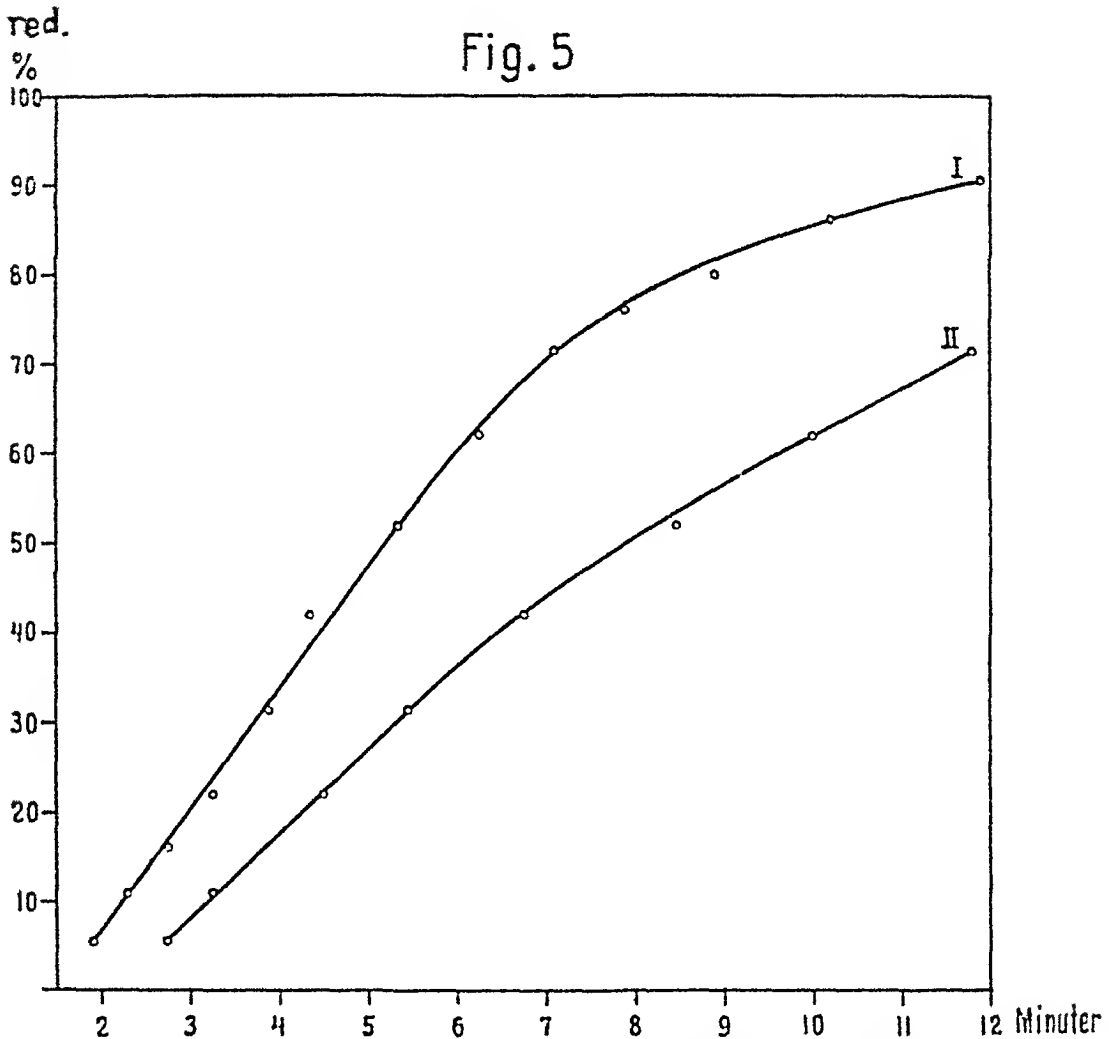


Fig. 5. Bs-Dehydrierung bei pH 7,18 % reduziertes Methylenblau.  
I ohne Malonat. II mit Malonat.

Grad der Hemmung X %.

$$\frac{X \cdot 1}{100 \cdot b} = b - \frac{1}{m} = \frac{m - b}{bm}; \quad X = \frac{100(m - b)}{m}$$

Die Malonathemmung der Succinodhydrogenase bei dem angegebenen Versuch wird dann berechnet. Aus Fig. 5. u. 6. ergibt sich folgendes: Bs-Dehydrierung. A (20 %) = 3,00 Minuten. B (58 %) = 5,85 Minuten. B—A = 2,85.

A' (80 %) = 4,25 Minuten. B' (42 %) = 9,35 Minuten. B'—A' = 5,10.

Die Bs-Dehydrierung wird von Malonat um 45 % gehemmt. Die entsprechenden Werte der Fumarsäurehydrierung sind:

haben, während die mit Kost 5, 6 und Weizenkleie + 1% Fischlebertran gefütterten Ratten niedrigere Werte aufweisen. Dagegen ist die Dichte des Knochens — wenn man darunter den prozentualen Calciumgehalt des Knochens versteht — bei Kost 1 am höchsten, bei Kost 2—6 im Verhältnis zueinander zwar gleich, doch im Verhältnis zu Kost 1 niedriger, und am geringsten bei den Tieren mit Weizenkleie + 1% Fischlebertran. Es darf hier vielleicht erneut darauf hingewiesen werden, dass der Calciumgehalt der Kostmischungen — 2,11 mg pro 1 g an der Luft getrocknete Kostmischung — niedrig ist. Die Tiere dürften daher gewisse Schwierigkeiten haben, ihre Depots aufzufüllen. Diese Schwierigkeiten erhöhen sich noch für die mit Weizenkleie + Fischlebertran gefütterten Ratten, da der Calciumgehalt ihres Futters nur 0,52 mg pro g an der Luft getrocknete Kost beträgt, also nur 39% des Calciumgehaltes der übrigen Kostmischungen gleichkommt.

Die mit Kost 2—4 gefütterten Tiere sind, miteinander verglichen, während des Wachstumsversuches gleich gut gewachsen, im Vergleich zu den Tieren mit Kost 1 besser. Die geringere Calciumdichte der ersteren Tiere dürfte sich folglich so deuten lassen, dass das Wachstum relativ schneller war als die Calciumaufspeicherung im Skelett, während diese Aufspeicherung bei Kost 1 gleichen Schritt mit dem Wachstum gehalten hat. Bei Kost 5 und 6 sind die Tiere nicht stärker gewachsen als bei Kost 1, doch zeigen ihre Femura eine geringere Calciumdichte.

Dass eine nur aus Weizenkleie + 1% Fischlebertran bestehende Kost einen sowohl absolut als prozentual niedrigen Calciumgehalt des Femur ergeben würde, war zu erwarten, auch wenn das Wachstum langsam war. Die Zufuhr von Calcium mit der Kost ist niedrig und der Verlust mit den Faeces beträchtlich.

Die Calciumretention bei Fütterung mit den verschiedenen Kostmischungen ist teils in Prozent der aufgenommenen Menge dieses Minerals, teils in mg während des Bilanzversuches (4 Wochen) retinierten Calciums herechnet worden (Tab. 37).

Die im Organismus verbliebene Calciummenge ist für die Tiere, die zusätzliches Vitamin B (Kost 2) erhielten, sowohl absolut als prozentual grösser als bei den Tieren mit einer Kost ohne diesen Zusatz (Kost 1) oder mit 2,1% Faser in der Kost (Kost 3). Die mit Kost 1 gefütterten Tiere haben eine höhere Calciumdichte der untersuchten Femura; man kann also eine bessere Füllung der Calciumdepots annehmen, wodurch sich die geringere Reten-

such wurde die Malonathemmung aus der Umsetzung von 29 % bis 60 % (bzw. 71 % bis 40 % berechnet.)

*Die obigen Versuche zeigen also, dass (innerhalb der Fehlergrenzen) die Malonsäure eine ungefähr gleich starke Hemmung auf Bs-Dehydrierung und Fumarsäurehydrierung ausübt.*

---

TABELLE 38.

Kost	Durchschnittl. Magnesium- gehalt pro 1 Femur (mg)		Magnesiumgehalt in % des Knochengewichts (getrocknet)
	Weibchen	Männchen	
1	0,70 ± 0,056	0,87	0,16 ± 0,011
2	2,20 ± 0,088	2,80	0,47 ± 0,009
3	1,88 ± 0,074	2,57	0,40 ± 0,017
4	2,05 ± 0,119	2,29	0,48 ± 0,032
5	1,62 ± 0,097	2,05	0,41 ± 0,004
6	1,61 ± 0,069	1,80	0,45 ± 0,011
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	1,00 ± 0,014		0,30 ± 0,046

Der Magnesiumgehalt der Femura (Tab. 38) ist absolut und prozentual bei den Tieren mit Kost 1 am niedrigsten, welche Tiere die höchste Calciumdichte zeigen. Wenn auch der Magnesiumgehalt des Skeletts nicht dieselbe Bedeutung hat wie der Calciumgehalt, so dürfte doch der niedrige Wert des Magnesiums in den Femura der Ratten mit Kost 1 eine kleinere Gesamtmenge Magnesium im Organismus anzeigen. Dies würde seinerseits dann die hohe prozentuale und absolute Magnesiumretention der Tiere mit dieser Kost erklären (Tab. 39). Es scheint ein gewisses, wenn auch nicht absolutes gegensätzliches Verhältnis zwischen der im Knochensystem gespeicherten Calcium- und Magnesiummenge zu bestehen.

Der folgende Versuch zeigt, dass auch die Mengen des *retinieren* Calciums und Magnesiums in gewissem Grade zueinander im umgekehrten Verhältnis stehen. 4 Gruppen von je 3 Rattenmännchen, die vorher eine calciumreiche Kost (etwa 10 mg Calcium pro g Trockenkost) bekommen hatten, werden in verschiedenem Alter auf Kost 1 gesetzt. Man hält sie dann 4 Wochen in Stoffwechsellkäfigen und untersucht während dieser Zeit die Calcium- und Magnesiumbilanz. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 und 4 graphisch dargestellt. Man findet, dass hoher Calciumretention eine niedrige Magnesiumretention entspricht, und umgekehrt. Es ist zu erwähnen, dass die Tiere in allen diesen Fällen eine Kost mit suboptimalem Vitamin-B-Gehalt bekommen haben.

Man kann auch feststellen, welche grosse Unterschiede die Retention dieser Minerale zeigt, je nachdem, in welchem Alter die Tiere auf diese Kost gesetzt werden. Mit zunehmendem Alter fällt es der Ratte schwerer, das Calcium einer Kost mit niedrigem Gehalt an diesem Stoff auszunützen. Dies wäre evtl. eine

Stoffwechsels in vivo vorkommen können. Eine Untersuchung des Einflusses der Bs auf den Darm in vivo dürfte sich daher erübrigen. — Dagegen wird der Herzmuskel durch schwächere Succinatkonzentrationen ( $n/25$ — $n/50$ ) beeinflusst. Auch diese Konzentrationen dürften jedoch in Stoffwechselversuchen nicht erreicht werden. Es kann indessen angezeigt sein, die Reaktion des Kreislaufapparates bei Einverleibung von Bs zu untersuchen, und zwar um so mehr, als in Vorversuchen bei intravenöser Injektion von Natriumsuccinat verstärkte Atmung festgestellt wurde.

*Methodik:* Die Atmung wurde durch eine in die Trachea eingelegte Y-Röhre registriert, deren einer Schenkel an eine Mareysche Kapsel angeschlossen war. Der Druck im rechten Vorhof wurde durch eine lange Glaskanüle registriert, die aus der V. jugularis in den rechten Vorhof hinabgeführt wird. Diese Kanüle wird mit einem Wassermanometer mit Schwimmer verbunden. Der arterielle Druck wurde in der Regel mittels einer T-Kanüle in der Art. femoralis gemessen, die an ein Membranmanometer angeschlossen wurde. Antikoagulans: Benzoechtrosa, das bekanntlich den Kreislauf nicht beeinflusst (KAULSON u. LANDBY 1938). Versuchstiere: Hunde und Kaninchen.

Bei Versuchen an *Hunden* mit Messung des Arterien- und Vorhofdrucks rief intravenöse Einverleibung von Bs Einschränkung der Herztätigkeit mit gesteigertem Vorhofdruck und geschwächtem Arteriendruck hervor. Die Bs-Menge, die zur Erzielung dieser Wirkung notwendig war, wechselte stark, vermutlich wegen der Heterogenität des Tiermaterials. Da es unmöglich war, hier ein homogenes Tiermaterial zu erhalten, ging ich dazu über, mit *Kaninchen* zu arbeiten.

Bei intravenöser Injektion von 80—90 ml Natriumsuccinat (2,5 %ig) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Min. vergrösserte sich die Atmungsamplitude, während die Atmungsfrequenz nur wenig, der Vorhofdruck und der arterielle Druck gar nicht beeinflusst wurden. In wiederholten Versuchen wurde festgestellt, dass intravenöse Injektion von 20 ml/kg Körpergewicht dieser Succinatlösung mit derselben Geschwindigkeit die Herztätigkeit unbeeinflusst liess (durch Arteriendruck und Vorhofdruck gemessen). Die leichte Senkung des Vorhofdrucks während der Succinatinjektion in einigen Versuchen dürfte auf der verstärkten Atmung beruhen.

Ausserdem wurde die Bs-Menge ermittelt, die zugeführt werden muss, damit die Herztätigkeit beeinflusst (eingeschränkt)

signifikant. Die mit den kleiehaltigen Kostmischungen gefütterten Tiere zeigen eine geringere absolute Magnesiummenge in den Femura, wenn das Futter ganz (Kost 6) oder teilweise (Kost 5) wärmebehandelt wird. Bei einer Kost von Weizenkleie allein + 1% Fischlebertran ist die in den Femura aufgespeicherte Magnesiummenge gering. Diese Kost ist von allen angewandten am magnesiumreichsten. Der Verlust mit den Fäkalien ist jedoch ausserordentlich hoch; während des Bilanzversuches überschreitet er die Menge des mit der Kost zugeführten Magnesiums.

Der Magnesiumgehalt des Skeletts ist, wie bereits angedeutet, im Vergleich zu der in gewissen anderen Organen vorhandenen Menge nicht sehr bedeutend. Aus den kleinen Unterschieden des Magnesiumgehaltes der Femura bei den mit Kost 2—6 gefütterten Ratten dürfte man daher keine sicheren Schlüsse bezüglich der relativen Magnesiummenge ziehen können, welche die Tiere bei diesem Futter gespeichert haben. Doch ist zu beachten, dass die Mittelwerte sowohl des absoluten als des prozentualen Magnesiumgehaltes bei den Tieren mit Kost 2 und 4 am höchsten sind. Diese Tiere erhielten das meiste Vitamin B. Sie haben auch (vgl. oben) eine verhältnismässig grosse Menge Calcium im Organismus zurückgehalten. Bei der hohen Vitamin-B-Zufuhr tritt also kein gegensätzliches Verhältnis zwischen den im Skelett aufgespeicherten Calcium- und Magnesiummengen in Erscheinung.

TABELLE 39.

Kost	Im Organismus verbliebenes Magnesium (mg)	Im Organismus verbliebenes Magnesium in % der aufgenommenen Menge
1	198 ± 33,0	24,6 ± 3,98
2	152 ± 31,2	18,3 ± 3,48
3	123 ± 33,6	12,5 ± 4,10
4	168 ± 13,8	16,1 ± 1,29
5	71 ± 49,1	6,8 ± 5,08
6	— 33 ± 39,5	— 3,9 ± 7,11
Weizenkleie + 1 % Fischlebertran	— 159 ± 99,9	— 6,7 ± 3,79

Die während des Bilanzversuches von den mit den verschiedenen Kostmischungen gefütterten Tieren retinierte Magnesiummenge ist teils in Prozent der aufgenommenen Magnesiummenge, teils in mg berechnet worden (Tab. 39).

Fig. 7 wiedergegebenen Versuch eine erheblich geringere Flüssigkeitsmenge injiziert als in den Versuchen mit 2,6%iger Succinatlösung. — Die stärkere Bs-Lösung ist hypertonisch. Dies dürfte indessen für die gefundene Wirkung ohne wesentliche Bedeutung sein.

Die geschilderten Versuche sagen nichts über die Ursache dieser Bs-Wirkung auf das Herz. Es lassen sich diesbezüglich mehrere Hypothesen aufstellen, doch liegt diese Frage ausserhalb des Rahmens meiner Untersuchung, weshalb ich sie offen lasse.

*Intravenöse Injektion von Bs (als Natriumsuccinat) bewirkt in kleinerer Dosis (0,33 g Bs/kg Körpergewicht mit 0,016 g Bs/Min.) eine leichte Vertiefung der Atmung, ohne den Kreislauf zu beeinflussen. Grössere Dosen (1,4—2,8 g Bs/kg Körpergewicht mit 0,07—0,11 g Bs/Min.) schwächen die Herzleistung.*

6) Bei einer Kost aus reiner Weizenkleie + 1% Fischlebertran ist der Calciumverlust mit den Faeces annähernd gleich der aufgenommenen Calciummenge. Das Fäkalmagnesium überschreitet während der Versuchsperiode die mit der Nahrung zugeführte Menge, weshalb die Tiere eine negative Magnesiumbilanz zeigen.

### C. Der Einfluss der Erhitzung auf das Vitamin B<sub>1</sub> der Weizenkleie.

In der Einleitung wurden Versuche referiert, die gezeigt hatten, dass der Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt des Brotes beim Backen nicht oder nur unbedeutend abnimmt. Doch hat man in der Kruste einen niedrigeren Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt gefunden als in der Krume. Da das Vitamin B<sub>1</sub> der Kleie einer ihrer wertvollsten Bestandteile zu sein scheint, ist eine Untersuchung des Einflusses, den die Erhitzung auf den Gehalt der Kleie an Vitamin B<sub>1</sub> ausübt, angezeigt.

TABELLE 40.

#### Vitamin-B-freie Kost

Reisstärke	160 g
Vitamin-B-freies Kasein	55 >
Salzmischung	15 >
Kokosfett	15 >
Fischlebertran	40—50 mg/Tag

#### Salzmischung

Natriumchlorid (NaCl)	52 g
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	116 >
Natriumphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O)	104 >
Calciumphosphat (Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O)	162 >
Kaliumphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	286 >
Calciumlactat	390 >
Ferricitrat	35 >

Der Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt der Weizenkleie wurde ermittelt, indem ich junge Ratten mit einer sonst Vitamin-B-freien Kost, der täglich eine gewisse Menge Weizenkleie als einzige Vitamin-B-Quelle beigegeben wurde, fütterte und das Wachstum der Tiere bei dieser Kost beobachtete. Die Zusammensetzung der



1940), zum andern der Umstand, dass diese Bs-Ausscheidung nach parenteraler Zufuhr von Malonsäure zunimmt (KRERS et. al., 1938).

Ausserdem hat man untersucht, wie Zuführung von Bs in vivo gewisse andere Stoffe beeinflusst. Die *Citronensäureausscheidung* mit dem Harn wird durch Zufuhr von Bs gesteigert (ORTEN-SMITH 1937; Literatur bei MARTENSSON 1940, KRUSIUS 1940). — Der *Glykogengehalt der Leber* steigt nach Zuführung von Bs, nicht aber der übrigen gesättigten Dikarbonsäuren von der Malonsäure bis zur Sebacinsäure. Fumarsäure, Apfelsäure und Oxallessigsäure haben dieselbe Wirkung wie Bs (PONSFORD u. SLEDLEY-MACLEAN 1932, MAJER u. REISNER 1933, STÖHR 1933, 1938). Die Ausscheidung von Glykose bei phlorizinvergifteten Hunden steigt nach Verabfolgung von Bs an (RINGER, FRANKÉL u. JONAS 1913). Diese Autoren sind auf Grund ihrer Ergebnisse der Ansicht, Bs könne Glykose bilden und stelle hier ein Intermediärprodukt bei der Umsetzung von Glutaminsäure, Arginin, Ornitin und Prolin dar. Die Zuführung von Bs bei Leberperfusion ruft eine Steigerung des Blutzuckers hervor (BLIXENKRONE-MÜLLER 1938). Der Verfasser hat indessen nicht kontrolliert, ob einer der möglicherweise bei der Bs-Umsetzung gebildeten Metaboliten (z. B. Fumarsäure) etwa die Blutzuckerbestimmung stören kann. — Die Einverleibung von Natriumsuccinat per os bewirkt eine starke *Alkalose* (BECKER-FREYSENG u. LIEBICH 1938). — Wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, ist die Umwandlung der Bs in vivo wenig erforscht.

Will man die normale Umsetzung der Bernsteinsäure kennenlernen, so muss teils die Bs-Elimination, teils die Bs-Bildung erforscht werden. Die *Untersuchung der Bs-Elimination* umfasst die Bestätigung der oben referierten Versuchsergebnisse, dass Bs eliminiert wird, worauf die Geschwindigkeit dieser Elimination festgestellt wird. Ferner wird untersucht, ob diese Fähigkeit, Bs zu eliminieren, eine Fähigkeit sämtlicher Gewebe oder nur gewisser Organe ist. Die *Untersuchung der Bs-Bildung* stellt sich folgende Fragen: Erfolgt normal eine Bs-Bildung? Ist eine etwaige Fähigkeit, Bs zu bilden, nur an gewisse Organe gebunden oder besitzen sämtliche Gewebe des Körpers diese Fähigkeit?

### Methodik.

Versuchstiere: in der Regel Kaninchen, in einigen Fällen Katzen. Narkosemittel: Urethan, 1 g pro kg Körpergewicht subcutan, während der Operation Äther. Antikoagulans: Heparin Vitrum. Arterielle Blutproben wurden der Art. femoralis oder der Art. carotis entnommen. Venenblutproben aus verschiedenen Organen wurden mit der Injektionsspritze nach Punktion der freigelegten Vene entnommen. Die Bs wurde mittels intravenöser

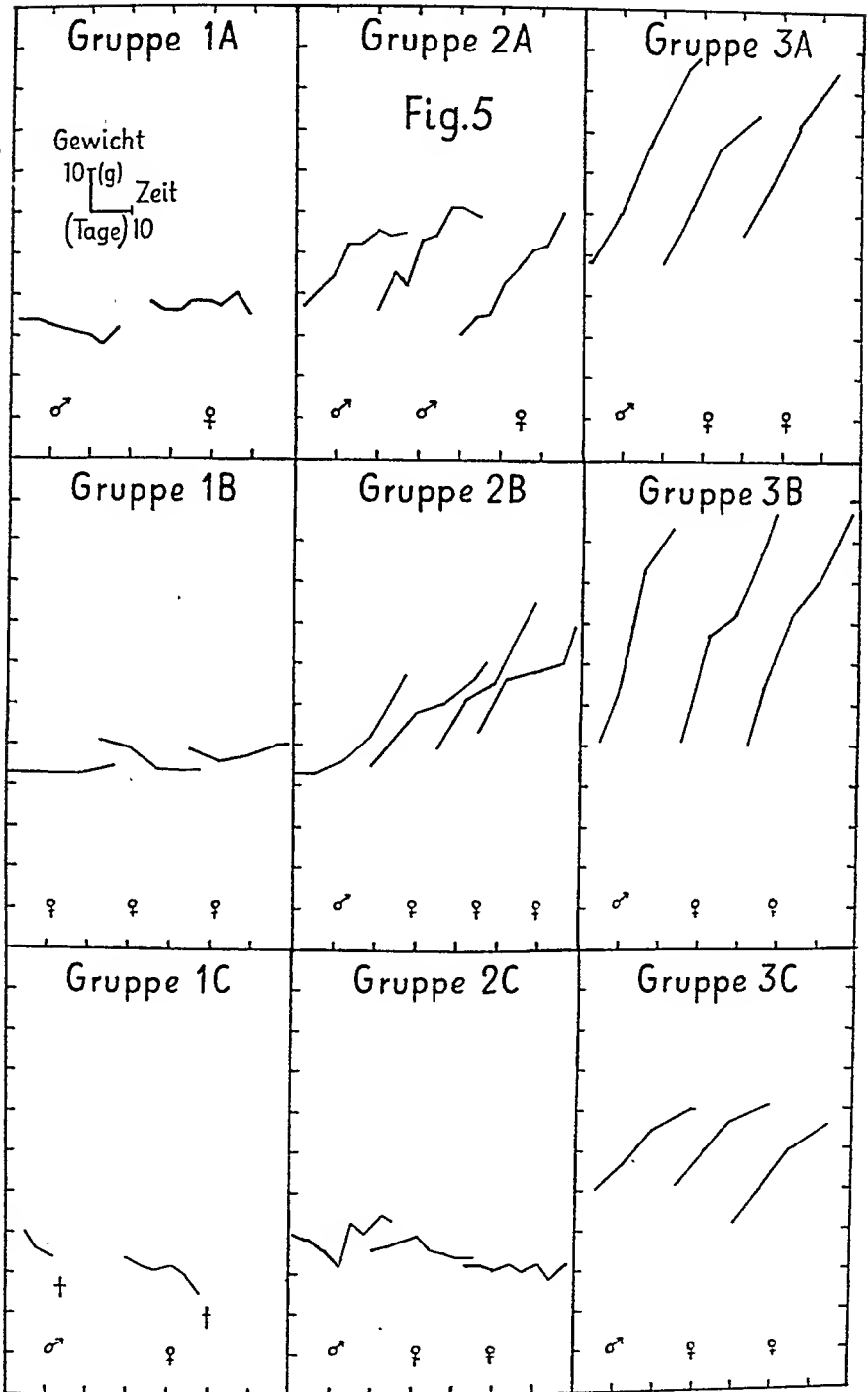


Fig. 5. Wachstum junger Ratten bei Vitamin-B-freier Kost mit Zusatz von Weizenkleie (vgl. den Text).

TABELLE 21.

7 Bs pro ml Plasma im Blut der					
Art. carotis	V. jugularis	V. femoralis	V. renalis	V. porta	V. hepatica
7	7	7	—	—	—
1	3	—	0	—	—
0	0	—	1	—	—
0	0	0	0	—	—
7	—	—	—	25	20
12	—	—	—	14	14
3	—	—	—	24	26
22	—	—	—	26	29
0	—	—	—	—	—
8					
2					
1					
6					
12					
0					
6					
6					
7					
1					
3					
2					
2					
2					
0					
0					
6					
5					
0					
0					
5					

### Elimination der Bs beim ganzen Tier.

Zuerst musste festgestellt werden, mit welcher Geschwindigkeit intravenös einverleibte Bs aus dem Blute eliminiert wird. Gleichzeitig war zu kontrollieren, dass die Elimination nicht eine Ausscheidung mit dem Harn ist.

Figur 8, S. 87, zeigt einige Beispiele solcher Eliminationsversuche.

Wie die Versuche zeigen, wird zugeführte Bs schnell aus der

täglichen Zusatz von 5  $\gamma$  Lactoflavin (Hoffmann-La Roche) zu dieser Kost, jedes Tier der Gruppe D 2 5  $\gamma$  Aneurin (Astra).

Wie aus den in Figur 6 wiedergegebenen Gewichtskurven hervorgeht, zeigen die Tiere mit zusätzlichem Lactoflavin praktisch keine Gewichtszunahme. Der Aneurinzusatz hingegen bewirkt ein gutes Wachstum.

LASSEN (1935) gibt an, bei einer im übrigen gleichwertigen Kost mit Vitamin B<sub>2</sub> im Überschuss sei das Wachstum junger Ratten dem Gehalt der Kost an Vitamin B<sub>1</sub> proportional, wenn das Vitamin B<sub>1</sub> nicht im Überschuss vorhanden ist. Die Tiere der Gruppe D 2 wachsen ungefähr gleich gut wie die Tiere der Gruppen 3 A und 3 B. In 500 mg K. 170° ist also so viel Vitamin B<sub>2</sub> enthalten, dass die jungen Ratten bei dieser Menge ebensogut wachsen können, als wenn sie einen täglichen Zuschuss von 750 mg unbeh. K. erhielten. In sämtlichen Gruppen A, B und C bekommen die Tiere eine grössere Menge Vitamin B<sub>2</sub>, als es zu ihrem Wachstum nötig wäre. Vitamin B<sub>2</sub> ist also im Überschuss vorhanden, und das verschieden starke Wachstum der jungen Ratten ist ein Ausdruck des verschiedenen Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehaltes der Kost.

### Zusammenfassung.

Wachstumsversuche an jungen Ratten haben gezeigt, dass das Vitamin B<sub>1</sub> der Weizenkleie durch einstündiges Erhitzen auf 97° nicht zerstört wird. Erhitzt man Weizenkleie hingegen 1 Stunde lang auf 170°, so wird  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  des ursprünglichen Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehaltes der Weizenkleie zerstört.

Aus praktischen Gründen kann sich eine erste Untersuchung nur auf wenige Organe des Körpers erstrecken. Die Organe, die nach der bisherigen einschlägigen Literatur (siehe v. EULER 1934, S. 512, BREUSCH 1937 a) am meisten Succinodehydrogenase enthalten, sind Muskel, Herz, Niere, Leber und Hirn. Herz und Leber lassen sich aus technischen Gründen mit dieser Methode schlecht untersuchen. Die Untersuchung der arterio-venösen Differenzen bei der Bs-Elimination umfasst daher nur Muskel, Hirn und Niere. Aus praktischen Gründen ist es schwierig, alle Organe auf ihre Fähigkeit, Bs zu eliminieren, zu untersuchen. Es werden daher mit wechselnder Technik nur gewisse Gruppen untersucht, bis man für ein oder einige Organe eine Bs-Elimination feststellt, die derjenigen des ganzen Tieres entspricht.

Um eine möglichst konstante Eliminationsgeschwindigkeit während des Versuches zu erzielen, wurde die Bs durch intravenöse Injektion mit konstanter Injektionsgeschwindigkeit während der ganzen Versuchsdauer (mit dem Infusionsapparat) zugeführt. Die Blutproben wurden erst einige Zeit (etwa 15 Min.) nach Beginn der Injektion entnommen, damit sich die Bs-Konzentration im Organismus inzwischen ausgleichen konnte. Die Dauer des Konzentrationsausgleichs ist nicht experimentell festgestellt. Bei Versuchen mit verschieden langer Zeit für diesen Ausgleich haben wir indessen im Prinzip dasselbe Ergebnis erhalten. — Die venösen und arteriellen Blutproben wurden nach Möglichkeit gleichzeitig entnommen, zur Technik siehe S. 84.

Die Tabellen 22 und 23 verzeichnen die Ergebnisse solcher Versuche.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das *Nierengewebe zugeführte Bs mit weit grösserer Geschwindigkeit eliminieren kann als die übrigen untersuchten Gewebe.*

TABELLE 22.

Art. carotis	γ Bs pro ml Plasma im Blut der		V. femoralis
	V. jugularis	Art. carotis	
359	334	376	311
272	224	349	265
75	71	108	85
		85	75
		70	61
		70	67 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Blutprobe nach 23 Minuten Succinatinjektion genommen.

wicht und Bezeichnung der Versuchspersonen sind aus Tabelle 41 ersichtlich.

Die Grundkost hatte bei den Stoffwechselversuchen folgende Zusammensetzung: 350 g Zucker, 250 ml fette Sahne, 50 mg Ascorbinsäure, 2 mg Aneurin (Astra) und 1000 ml destilliertes Wasser pro Tag. Diese Menge liefert etwa 2300 Kal. Die Versuchspersonen verzehrten die Grundkost teils allein, teils mit zusätzlicher Weizenkleie.

TABELLE 41.

Versuchsperson (Bezeichnung)	Alter	Gewicht
M 1	28 Jahre	81 kg
M 2	32 „	89 „
F 1	26 „	56 „
F 2	26 „	60 „

Die für diese Versuche verwendete Weizenkleie war nicht von derselben Partie, die für die bisher beschriebenen in vitro- und Tierversuche gebraucht worden war. Doch war es Kleie, die bei gleicher Ausmahlung nach Abscheidung von 80% Mehl erhalten worden war, und sie war ebenso behandelt worden. Ihr Gehalt an den hier zu untersuchenden Stoffen sowie an Rohfaser ist aus Tabelle 42 zu ersehen. Die Stickstoffmenge ist dieselbe, der Magnesiumgehalt etwas höher und der Calcium- und Rohfasergehalt etwas niedriger als in der früher verwendeten Kleie (vgl. Tab. 11).

TABELLE 42.

Weizenkleie  
(An der Luft getrocknet)

	%
Stickstoff	2,369
Calcium	0,079
Magnesium	0,480
Rohfaser	9,3

Die Weizenkleie wird in feiner Schicht auf Blechen ausgebreitet und 1 Stunde lang teils auf 97° (= K. 97°), teils auf 170° (= K. 170°) erhitzt. Bei Erhitzung auf die erstgenannte Temperatur ist der Wasserverlust nicht so gross, dass eine mengenmässige Veränderung der in der Weizenkleie enthaltenen Stoffe hätte festgestellt werden können. Bei Erhitzung während

TABELLE 24.

	$\gamma$ Bs/ml Plasma
Normalwert .....	0
Venenblut 90 Minuten nach der Bs-Zufuhr .....	82 <sup>1</sup>
Arterienblut 90 Minuten nach der Bs-Zufuhr .....	88 <sup>1</sup>

Kaninchen, 3,0 kg, Perfusion des Hinterkörpers. Urethan 1 g/kg. Gewicht des Hinterkörpers 1,0 kg. Perfusionsflüssigkeit 175 ml Heparinblut. Zusatz von 31,2 mg Bs zum Blut.

Die Bs verteilt sich vermutlich nicht gleichmässig über das Hinterkörperpräparat. Für gewisse Gewebe, so Knochen- und Knorpelgewebe, dürfte die Diffusion äusserst gering sein. BLIXENKRONE-MÖLLEN (1938) gibt an, ein Hinterkörperpräparat bestehe zu etwa 50 % aus Muskeln. Legen wir diese Zahl zugrunde, so würde sich in unserem Fall die zugesetzte Bs auf 500 g Gewebe + 175 ml Blut verteilen, was 46,2  $\gamma$  Bs/g Gewebe entspricht. Bei Abschluss des Versuchs war die Bs-Konzentration des Venenblutes 82  $\gamma$ /ml Plasma.

Aus diesem Versuch lässt sich nicht entscheiden, ob die Muskulatur<sup>2</sup> langsam Bs umsetzen kann oder nicht. Die arteriovenöse Differenz ist auch zu klein, um diese Frage beantworten zu können.

Ähnliche Perfusionsversuche wurden mit Leber gemacht. Hier sinkt auch die Bs-Konzentration des Blutes nach Zuführung von Bs so langsam, dass der „Ausgleichwert“ im Laufe des Versuchs nicht erreicht wurde. Die Versuchsdauer darf bei Perfusionen nicht über 2 Stunden betragen (BLIXENKRONE-MÖLLEN 1938). Mit dieser Methodik lässt sich also nicht entscheiden, ob die Leber eine geringe Fähigkeit besitzt, intravenös eingegebene Bs umzusetzen oder nicht. —

Bei Versuchen mit von der Leber gebildeter Bs ist die Eliminationsfähigkeit dieses Organs äusserst gering. Vermindert man bei Perfusionsversuchen mit Leber die Sauerstoffzufuhr, so steigt der Bs-Gehalt des Perfusionsblutes. Dabei muss ja auch der Bs-Gehalt des Gewebes gestiegen sein. Untersucht man hier die Bs-Konzentration des Perfusionsblutes, so findet man ein äusserst langsames Absinken.

<sup>1</sup> Bs nach Elimination von  $\alpha$ -Ketoglutarat bestimmt.

<sup>2</sup> Hier wird von „Muskulatur“ gesprochen, doch können natürlich auch andere Gewebe bei der Elimination der Bs eine gewisse Rolle spielen, wahrscheinlich jedoch ist diese von untergeordneter Bedeutung.

die Versuchsperson nur eine der Kostmischungen A—D in einer Menge, die etwa 2300 Kal./Tag lieferte, dazu die Kalorien, die mit der Weizenkleie der betreffenden Mischung zugeführt werden konnten. Die Kost wurde in vier etwa gleichen Mahlzeiten am Tage eingenommen. Ein Versuchstag wurde von 00 Uhr—24 Uhr gezählt. Die beiden ersten Tage jeder Fünftagesperiode dienten zur Gewöhnung an die Versuchsbedingungen. An den drei folgenden Tagen wurden Harn und Faeces täglich für sich gesammelt. Der Harn wurde unter Toluol aufbewahrt. Um die Fäkalien der verschiedenen Versuchsperioden voneinander abzugrenzen, mussten die Versuchspersonen nach der letzten Mahlzeit jeder Fünftagesperiode  $\frac{1}{4}$  g Karmin einnehmen. Die Fäkalien wurden gewogen und sofort bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Harn- und Faecesmengen wurden berechnet.

TABELLE 44.

Versuchsperson	Verabreichte Kost:				
	10 Tage		10 Tage		5 Tage
	5 Tage	5 Tage	5 Tage	5 Tage	
M 1	Kost A	Kost C	Kost B	Kost A	Kost D
M 2	› A	› D	› C	› A	
F 1	› A	› C	› B	› A	
F 2	› A	› B	› D	› A	

Tabelle 44 zeigt, wie sich die Kostmischungen während des Stoffwechselversuches verteilten. In der ersten Periode erhielten die Versuchspersonen zuerst fünf Tage lang die Grundkost und dann eine Kost mit Kleie. In der zweiten Versuchsperiode wurde dagegen zuerst die Kleiekost verabfolgt, dann fünf Tage lang die Grundkost. Die dritte Versuchsperiode für M 1 umfasste nur fünf Tage mit Grundkost + verdauter Weizenkleie (Kost D).

Nur M 1 hat sämtliche Kostmischungen erhalten, die übrigen Versuchspersonen nur drei.

Im Harn und in den Faeces wurden Stickstoff, Calcium und Magnesium bestimmt. Doppelproben wurden stets ausgeführt. Der Mittelwert der bei den verschiedenen Kostmischungen pro Tag ausgeschiedenen Menge der betreffenden Stoffe teils im Harn, teils in den Faeces, ist berechnet worden. Bei Kost A gründen sich die Werte auf Analysen aus zwei Fünftagesperioden (je 6 Werte für Harn und Faeces pro Stoff und Versuchsperson); bei den übrigen Kostmischungen nur auf eine Fünftagesperiode pro Versuchsperson (je 3 Werte für Harn und Faeces pro Stoff).



nähernd ausgeglichen (siehe Tabelle 22). Es ist also *wahrscheinlich, dass die Nieren Bs umsetzen*. Es ist möglich, dass die Nieren in Anbetracht ihrer geringen Masse trotz ihrer grossen Fähigkeit, Bs schnell zu eliminieren, für die Bs-Elimination des Organismus nicht so wesentlich sind, wie z. B. die Muskulatur mit ihrer langsamen Elimination, dafür aber grossen Masse. Um die Bedeutung der Nieren für die Bs-Elimination des Organismus in Erfahrung zu bringen, wurden Eliminationsversuche sofort nach Exstirpation der Nieren gemacht.

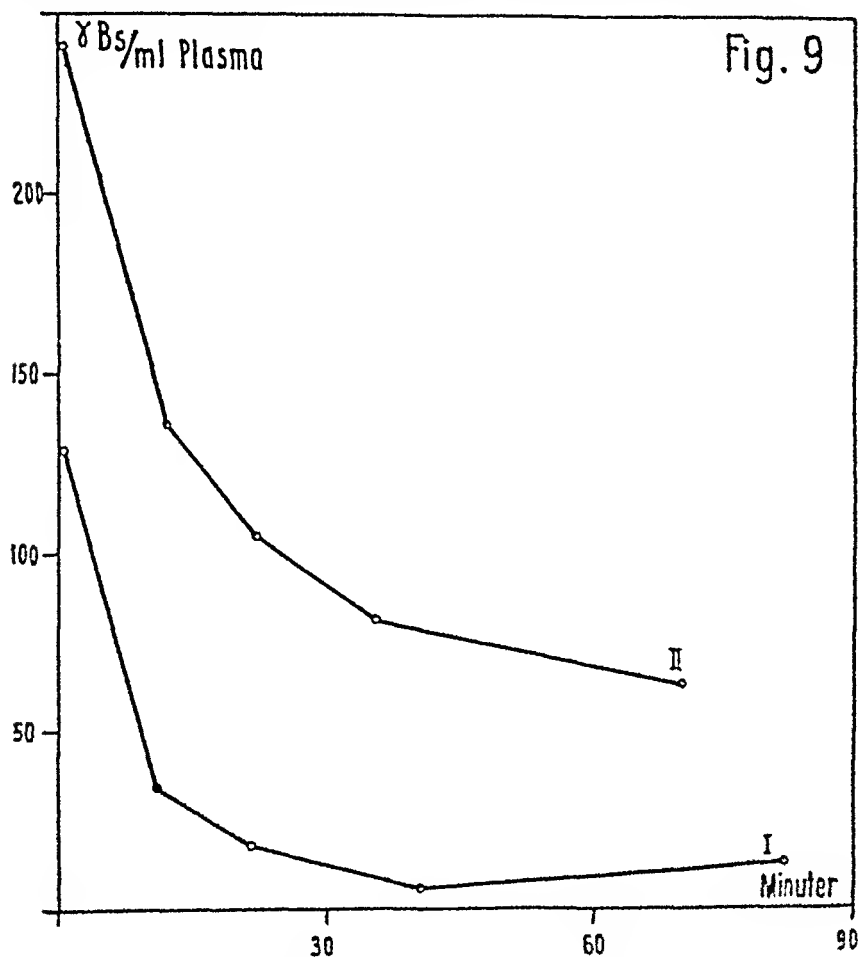


Fig. 9. Bs-Elimination nach Nierenexstirpation.

Kaninchen in Urethan-Narkose. Bs intravenös injiziert während 3 Minuten.

I. (Zum Vergleich angegeben.) Ohne Nierenexstirpation. 58,5 mg Bs pro kg Körpergewicht injiziert.

II. 30 Minuten nach Nierenexstirpation 68,4 mg Bs pro kg Körpergewicht injiziert.

TABELLE 45.

Versuchsperson	Menge der durchschnittl. pro Tag ausgeschiedenen Faeces (Trockengewicht)			
	Kost A	Kost B	Kost C	Kost D
M 1	9,1 g	20,4 g	21,4 g	18,1 g
M 2	8,7 »		31,6 »	19,9 »
F 1	6,8 »	21,6 »	16,6 »	
F 2	6,5 »	16,3 »		15,3 »
Mittelwert	7,8 g	19,4 g	23,2 g	17,8 g
Vergleichszahl		7,5 »	8,2 »	8,1 »
Zunahme im Verhältnis zu Kost A		11,9 »	15,0 »	9,7 »

Tag 2,2 g Faeces (Trockengewicht) ausscheidet. (LEHMANN und Mitarbeiter (1893) geben Zahlen von Versuchen mit zwei Menschen an, die bei Fasten 3,8 g bzw. 2 g Faeces (Trockengewicht) ausschieden. Dass Kost A eine grössere Kotmenge liefert, braucht jedoch nicht als eine Ausscheidung unresorbierter Bestandteile der Sahne oder des Zuckers gedeutet zu werden. Nach RIEDER (1884) steigert die Verdauungsarbeit die Menge der Verdauungsflüssigkeiten, die nur teilweise wieder resorbiert werden. Dies erklärt die grössere Fäkalienmenge auch bei leicht resorbierter Kost.

Sämtliche Versuchspersonen scheiden bei Kost B mehr Fäkalien aus als bei Kost A. Die wohlbekanntete Fähigkeit der Kleie, die Faecesmenge zu steigern, tritt hier deutlich in Erscheinung. Von den beiden Versuchspersonen, die sowohl Kost B als Kost C erhalten haben, zeigt die eine eine leichte Zunahme, die andere eine Abnahme der Kotmenge bei Kost C. Vergleicht man wieder die Kotmenge bei Kost B und D, so sieht man, dass die beiden Versuchspersonen, die sowohl Kost B als auch Kost D erhalten haben, bei Kost D etwas weniger ausscheiden. Trotz Auslösung von 60% der Weizenkleibestandteile in Kost D ergibt sich jedoch eine relativ grosse Menge Faeces.

Die Faecesausscheidung der verschiedenen Versuchspersonen bei gleicher Kost wechselt stark. Der Mittelwert sämtlicher Versuchspersonen mit einer Kost dürfte jedoch sicherer sein, als der Mittelwert jeder einzelnen Versuchsperson. Da nicht sämtliche Versuchspersonen sämtliche Kostmischungen erhalten haben, lassen sich die Mittelwerte der einzelnen Kostmischungen nicht direkt vergleichen. Es ist daher eine sog. Vergleichszahl eingeführt worden. Unter Vergleichszahl verstehe ich hier den Mittelwert der Kotmenge, die bei Kost A von denselben Versuchspersonen

Das Ergebnis dieses Versuches macht es wahrscheinlich, dass nach Zufuhr von Bs die  $\alpha$ -Ketoglutaratsäurekonzentration des Blutes gesteigert wird. Diese Versuche werden fortgesetzt und in einer späteren Arbeit erörtert.

*Für die Bs-Elimination des Organismus sind die Nieren von vorherrschender Bedeutung. Die Bs wird hier grösstenteils umgesetzt. Die Harnausscheidung beläuft sich auf höchstens 5 % der zugeführten Menge Bs. Die Leber kann wahrscheinlich Bs mit geringer Geschwindigkeit umsetzen. Ob Muskulatur und Gehirn mit sehr geringer Geschwindigkeit oder gar nicht Bs umsetzen können, lässt sich mit dieser Methodik nicht entscheiden.*

### Die Bs-Bildung des ganzen Tieres.

Dass der Organismus die Fähigkeit besitzt, Bs zu eliminieren, beweist noch nicht, dass normal eine Bs-Umsetzung und damit eine Bs-Bildung erfolgt. Dass Bs normal in den Geweben vorkommt und dass Bs normal mit dem Harn ausgeschieden wird, kann indessen anzeigen, dass die Bs ein Glied des normalen intermediären Stoffwechsels ist.

Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten für eine etwaige Umwandlung von Bs. *Bs kann in einem Organ (oder mehreren Organen) gebildet und in einem anderen eliminiert werden.* In diesem Fall dürfte die Bs mit dem Blute vom Herstellungszum Eliminationsort gebracht werden. Stoffe, deren Umsetzung in vivo wahrscheinlich nach diesem Prinzip vor sich geht, sind z. B. Acetonkörper und Citronensäure. Die ersteren werden grösstenteils in der Leber gebildet und hauptsächlich in der Muskulatur eliminiert (Literatur siehe bei BLIXENKRÖNE-MÖLLER 1938). Citronensäure wird wahrscheinlich in den Muskeln gebildet und hauptsächlich in den Nieren eliminiert (Literatur siehe bei MÄRTENSSON 1940). — Die zweite Möglichkeit ist die, *dass Bildung und Elimination der Bs in einem und demselben Organ sich vollzieht.* In diesem Fall hat der Blutkreislauf an der Bs-Umsetzung keinen Anteil.

Wenn die Bs-Bildung in einem Organ (oder in mehreren) stattfindet und die Umsetzung an anderer Stelle im Organismus, so muss dies sich auf zweierlei Weise experimentell feststellen lassen.

1. Das Venenblut des Bs-bildenden Organs muss einen höheren Bs-Gehalt haben als das arterielle Blut. Die gefundenen Normalwerte für den Bs-Gehalt des Venenblutes (S. 86) zeigen keine solche Differenz an. Der Unterschied kann indessen innerhalb der Fehlergrenzen der Methode

ursprünglichen Menge verdaut worden ist, liefert im Durchschnitt eine Zunahme der Kotmenge, die nur um 8% unter der von der entsprechenden Menge nicht verdauter Weizenkleie verursachten liegt. *Bei Verzehr von Kleie verursacht also die Zellulose den grössten Teil der dabei zu beobachtenden Zunahme der Kotmenge.*

## B. Der Stickstoffumsatz.

Der Stickstoffumsatz wurde dadurch untersucht, dass ich die Stickstoffmenge bestimmte, die mit dem Harn und den Faeces bei den verschiedenen Kostmischungen, deren Gehalt an Stickstoff bekannt ist, ausgeschieden werden. Der Stickstoffverlust durch die Haut ist vernachlässigt worden.

### 1. Der Stickstoffverlust mit den Faeces.

Tabelle 46 zeigt den Stickstoffverlust durch die Faeces im Mittel pro Versuchsperson und Tag bei den einzelnen Kostmischungen. Die Stickstoffmenge ist in mg angegeben.

TABELLE 46.

Versuchsperson	Stickstoff in den Faeces			
	Kost A	Kost B	Kost C	Kost D
M 1	496 mg	711 mg	934 mg	618 mg
M 2	337 „		1141 „	560 „
F 1	438 „	646 „	722 „	
F 2	404 „	502 „		567 „
Mittelwert	419 mg	620 mg	932 mg	582 mg
Vergleichszahl		446 „	424 „	412 „
Zunahme im Verhältnis zu Kost A		174 „	508 „	170 „

Bei Kost A werden mit den Faeces im Durchschnitt 419 mg Stickstoff pro Tag ausgeschieden. Diese Menge ist niedriger, als sie RIEDER (1884) bei einer stickstofffreien oder stickstoffarmen Kost aus Stärke, Zucker, Schmalz und Weinstein fand. RIEDER untersuchte 3 Versuchspersonen; Versuchsdauer 3 Tage. Die Faecesmenge war 13,4, 15,4 und 13,35 g pro Tag mit 0,51 bzw. 0,87 und 0,78 g Stickstoff. Dass RIEDER eine grössere Stickstoffmenge in den Faeces fand, als sie in den hier vorgelegten Versuche festgestellt wurde, dürfte darauf beruhen, dass seine Versuchspersonen eine grössere Menge Faeces ausschieden.

Dehydrierung. Der dabei aktivierte Wasserstoff wird in vitro direkt auf das Cytochromsystem<sup>1</sup> und von dort auf Sauerstoff übertragen. Die Bs-Elimination müsste sich demnach durch eine *Verminderung der Sauerstoffzufuhr* hemmen lassen, durch eine *Hemmung der Cytochromoxydase* (z. B. mit Cyanid) und durch *Hemmung der Succinodehydrogenase* beispielsweise mit Malonat oder Pyrophosphat.

#### *Verminderte Sauerstoffzufuhr:*

Kaninchen in Narkose wie oben (siehe S. 84), Entnahme der Blutprobe zur Bs-Bestimmung aus Art. carotis. Die Trachea wird freigelegt, es wird eine Trachealkanüle gelegt und an eine Pumpe zur künstlichen Atmung angeschlossen. Durch einen Schnitt ins Epigastrium und einen kleinen Schnitt ins Diaphragma wird der Thorax eröffnet, so dass die Bewegungen des Herzens und der Lungen während des Versuches direkt beobachtet werden können. Zu Beginn dieser Untersuchung wurde bei den Versuchstieren Anoxämie hervorgerufen, indem die Pumpe so lange gesperrt wurde, wie es die Tiere vertragen konnten. Dann wurde die künstliche Atmung mit gleicher Pumpamplitude und -frequenz wie vor der Anoxämie wiederaufgenommen. Dadurch ergibt sich ein Sauerstoffdefizit, das sich nicht durch tieferes oder schnelleres Atmen (die Atmung wird durch die Pumpe konstant gehalten) wettmachen lässt. — Später ging ich dazu über, die Amplitude der Atmungspumpe so stark zu senken, wie es die Versuchstiere anhalten konnten. Die für das Tier geeignete Verminderung der Sauerstoffzufuhr beurteilt man aus der Grösse der spontanen Atmungsbewegungen, der Grösse der Lungenbewegungen und der Herzfrequenz. Eine sehr verlangsamte Frequenz zeigt den heranahenden Exitus an. Nach einer gewissen Zeit, während welcher Blutproben zur Bs-Analyse entnommen worden sind, wird die Amplitude der Atmungspumpe wieder so vergrössert, dass der Sauerstoffbedarf des Tieres voll befriedigt wird. Das Atmungszentrum ist bekanntlich gegen ungenügende Lüftung sehr empfindlich. Als Indikator für ausreichende Sauerstoffzufuhr dienen die spontanen Atmungsbewegungen. Wenn diese praktisch aufgehört haben, in der Regel einige Minuten nach der Steigerung der Sauerstoffzufuhr, kann man den Sauerstoffbedarf des Tieres für befriedigt ansehen.

Es ist wichtig, die Amplitude der Atmungspumpe nicht mehr zu vergrössern, als notwendig ist, um die spontanen Atmungsbewegungen verschwinden zu lassen. Eine zu starke Ventilation kann binnen kurzem dazu führen, dass das Herz des Versuchstieres stehenbleibt. — Diese Technik hat den Vorteil, dass sich die Verminderung der Sauerstoffzufuhr leichter

<sup>1</sup> Man glaubt neuerdings nachgewiesen zu haben, dass ein Stoff den Wasserstofftransport zwischen Succinat/Succinodehydrogenase und Cytochrom vermittelt (HOPKINS, LUTWAK-MANN u. MORGAN 1939 und STERN u. MELNICK 1939, zitiert nach STERN 1940).

(88%), so bekommt man einen Begriff davon, welche grosse Bedeutung die Erhitzung auf 170° unter diesen Bedingungen für den Stickstoffverlust durch die Faeces hat. Das Rösten steigert den Verlust an Stickstoffprodukten durch die Faeces mehr, als es die Zellulose der Weizenkleie tut.

## 2. Die Stickstoffbilanz.

Die Stickstoffbilanz wurde als Unterschied zwischen dem mit der Nahrung aufgenommenen und dem in Harn + Fäkalien ausgeschiedenen Stickstoff bestimmt. Bei der geringen Stickstoffzufuhr dieser Versuche muss eine negative Stickstoffbilanz eintreten. Es ist daher zu erwarten, dass der resorbierte Stickstoff in möglichst grossem Ausmass für den Aufbau körpereigener Substanz verwendet wird. Die Stickstoffbilanz, in Gramm ausgedrückt, auf Versuchsperson und Tag berechnet, ist aus Tabelle 47 zu ersehen.

TABELLE 47.

Versuchsperson	Stickstoffbilanz			
	Kost A	Kost B	Kost C	Kost D
M 1	— 3,86 g	— 2,72 g	— 3,49 g	— 4,08 g
M 2	— 4,13 »		— 4,76 »	— 4,18 »
F 1	— 2,35 »	— 1,48 »	— 2,89 »	
F 2	— 2,78 »	— 2,52 »		— 2,48 »
Mittelwert	— 3,28 g	— 2,24 g	— 3,71 g	— 3,58 g
Vergleichszahl		— 3,00 »	— 3,45 »	— 3,59 »
Zunahme im Verhältnis zu Kost A		+ 0,76 »	— 0,26 »	+ 0,01 »

Die Stickstoffbilanz der Kostmischungen B—D, verglichen mit derjenigen bei Kost A, zeigt:

1. Bei Kost B eine weniger negative Bilanz bei sämtlichen Versuchspersonen.

2. Bei Kost C eine weniger negative Bilanz einer Versuchsperson (M 1), während zwei Versuchspersonen eine stärker negative Bilanz zeigen.

3. Bei Kost D unveränderte Stickstoffbilanz einer Versuchsperson (M 2), eine stärker negative Bilanz einer anderen (M 1) und eine weniger negative einer dritten Versuchsperson (F 2).

Führt man auch hier entsprechend wie oben Vergleichszahlen ein und zieht die Vergleichszahlen von den Mittelwerten der betreffenden Kostmischungen ab, so stellt man folgendes fest:

Fig. 11

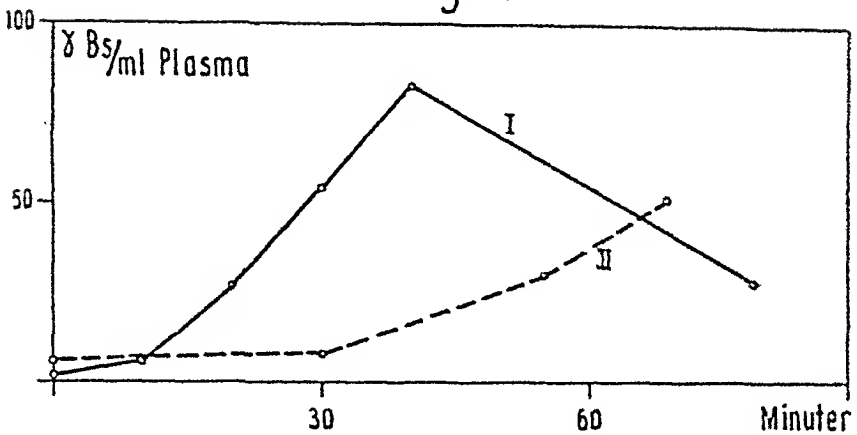


Fig. 11. *Bs*-Konzentration in Plasma bei verminderter Sauerstoffzufuhr. Kaninchen in Urethan-Narkose.

I. Verminderung der Sauerstoffzufuhr während der ersten 30,5 Minuten.

II. Verminderung der Sauerstoffzufuhr während der ersten 34 Minuten.

Fall ist der *Bs*-Wert im Blute während der Anoxämie annähernd unverändert, und er steigt erst an, nachdem wieder die volle Sauerstoffzufuhr eingesetzt hat.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der ersten Erscheinung wurde schon bei der Beschreibung der Versuchstechnik S. 96 vorgelegt. Die Ursache des Phänomens kann auch darin liegen, das bei Anoxämie in den Geweben schnell *Bs* gebildet wird, während die Elimination und die Diffusion ins Blut langsam erfolgt. Dies kann es auch erklären, weshalb man bei der letzteren Technik bisweilen erst dann eine *Bs*-Steigerung sieht, nachdem die volle Sauerstoffzufuhr wieder eingesetzt hat. Die Zunahme der *Bs* im Blut ist bisweilen nicht reversibel. Die Begleichung des während der Anoxämie eingetretenen grossen Sauerstoffdefizits kann durch den starken Aderlass erschwert worden sein, den die wiederholte Entnahme von Blutproben zur *Bs*-Bestimmung bedeutet (10 ml Blut für eine Doppelbestimmung). In gewissen Fällen ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass eine irreversible Zellschädigung während der Anoxämie entstanden ist. Dass dies jedoch von geringerer Bedeutung ist, erhellt daraus, dass unter gewissen Versuchsbedingungen (siehe Fig. 11) ein reversibler *Bs*-Effekt erhalten wird.

Eine verminderte Zufuhr von Sauerstoff in die Gewebe dürfte die Ursache dessen sein, dass der *Bs*-Gehalt des Blutes nach

2. Durch einen Vergleich der Stickstoffverluste mit den Faeces und der Stickstoffbilanz bei kleiefreier Kost mit denjenigen bei Kost mit verdauter Kleie kann man den aus den Verdauungssäften stammenden Fäkalstickstoff sowie die aus den betreffenden Kleiesorten resorbierte Stickstoffmenge berechnen.

a) Bei täglichem Verzehr von 30 g K. 97° beläuft sich die Resorption auf 88% der in dieser Kleie enthaltenen Stickstoffmenge.

b) Der durch die Röstprodukte verursachte Stickstoffverlust mit den Faeces ist grösser als der durch die Kleiezellulose verursachte Stickstoffverlust.

c) Bei einer Grundkost, bestehend aus Sahne und Zucker (etwa 2300 Kal.), ist die Stickstoffzufuhr absichtlich gering. Die Versuchspersonen zeigen eine negative Stickstoffbilanz. Einverleibung von Kleiezellulose bewirkt keine Veränderung dieser Bilanz. Eine Zufuhr von 30 g K. 97° pro Tag verbessert die Stickstoffbilanz. Einverleibung gerösteter Kleie hingegen verschlechtert sie, obwohl eine gewisse Menge der in der Kleie enthaltenen Stickstoffprodukte resorbiert wird. Rösten der Kleie bei 170° während einer Stunde verursacht nicht nur einen Mehrverlust von Stickstoff mit den Faeces durch gesteigerte Absonderung von Verdauungssäften, es verändert auch die Stickstoffprodukte, wodurch diese für den Aufbau körpereigener Substanz weniger wertvoll zu werden scheinen.

3. Eine Zunahme des Fäkalstickstoffs braucht keine verschlechterte Stickstoffbilanz zu bedeuten. Bei grösserem Bedarf an Darmsaftstickstoff kann der Organismus diesen durch entsprechende Verminderung der Stickstoffausscheidung mit dem Harn kompensieren.

### C. Der Calcium- und Magnesiumstoffwechsel.

Der Calcium- und Magnesiumstoffwechsel wurde untersucht, indem ich die Mengen dieser Stoffe, die bei den verschiedenen Kostmischungen mit Harn und Faeces ausgeschieden werden, bestimmte. Der Gehalt der Kostmischungen an diesen Mineralen ist bekannt (Tab. 43).



wickeln. (Aus den Anoxämieversuchen ging hervor, dass eine gewisse Zeit erforderlich ist, damit sich eine Steigerung des Bs-Gehaltes im Blute einstellen kann.) Ein solcher Atmungsstillstand kann durch künstliche Atmung behoben werden. Eine erneute Cyanidinjektion kann einen abermaligen Stillstand der Atmung verursachen, der seinerseits wiederum durch künstliche Atmung behoben werden kann. Erst indem ich so wiederholte Male in schneller Folge einen Atmungsstillstand hervorrief, konnte ich die Bs-Konzentration des Blutes steigern. Die Versuchsbedingungen sind hier nicht rein. Die Bs-Steigerung kann auch durch mangelnde Sauerstoffzufuhr infolge des wiederholten Atmungsstillstandes verursacht sein. Es war praktisch also unmöglich, eine „chronische“ Cyanidvergiftung der Versuchstiere hervorzurufen.

Das Atmungszentrum dürfte der gegen Cyanid empfindlichste Teil des Organismus sein. Es ist möglich, dass zufriedenstellende Ergebnisse bei Versuchen mit decerebrierten Tieren hätten erhalten werden können. Die Cyanidversuche wurden indessen nicht fortgesetzt, da schon die Anoxämieversuche äusserst wahrscheinlich machen, dass normal in vivo eine Bs-Umsetzung stattfindet.

*Hemmung der Succinodehydrogenase:* Durch die Anoxämieversuche ist gezeigt worden, dass normal in vivo eine Umsetzung von Bs vor sich geht. Es ist indessen doch von Interesse zu untersuchen, wie eine direkte Hemmung der Succinodehydrogenase die Bs-Konzentration im Organismus beeinflusst. Dieses Enzym wird durch Malonsäure, Pyrophosphorsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure stark gehemmt. Von der spezifischen Hemmung der Malonsäure auf die Succinodehydrogenase war schon die Rede (siehe S. 68). Die Spezifität der Hemmung ist zwar nur eine relative, doch ist die Hemmung der Succinodehydrogenase so stark, dass die Malonsäure für unsern Zweck geeignet sein dürfte. Die Pyrophosphorsäure hemmt die Succinodehydrogenase (LELOIR u. DIXON 1937), doch hemmt sie auch stark die  $\beta$ -Oxybuttersäuredehydrogenase (Literatur siehe bei HOFF-JØRGENSEN 1940). Ein Enzym im Organismus, Pyrophosphatase, eliminiert ausserdem schnell Pyrophosphorsäure, die also aus mehreren Gründen für unsere Untersuchung ungeeignet ist.  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure hemmt zwar die Succinodehydrogenase stark (siehe S. 52), kann aber mit grosser Wahrscheinlichkeit im Organismus zu Bs umgesetzt werden, was sie für diesen Zweck ungeeignet macht. Malonsäure ist also im Augenblick der ein-

TABELLE 49.

Versuchsperson	Magnesiumverlust mit den Faeces			
	Kost A	Kost B	Kost C	Kost D
M 1	12 mg	71 mg	105 mg	20 mg
M 2	15 „		87 „	33 „
F 1	15 „	125 „	90 „	
F 2	9 „	94 „		13 „
Mittelwert	13 mg	97 mg	94 mg	22 mg
Vergleichszahl		12 „	14 „	12 „
Zunahme im Verhältnis zu Kost A		85 „	80 „	10 „

des im Kot enthaltenen Magnesiums im Verhältnis zu Kost A grösser als die Menge des mit der verdauten Weizenkleie zugeführten Magnesiums. Diese überschüssige Magnesiummenge muss aus unresorbierten Darmsäften stammen.

Vergleicht man die Werte bei Kost B und Kost C, so findet man, dass von den beiden Versuchspersonen, die diese beiden Kostmischungen erhalten haben, die eine (M 1) den höchsten Magnesiumgehalt der Faeces bei Kost C zeigt, die andere (F 1) bei Kost B. Führt man entsprechend wie oben Vergleichszahlen an und berechnet die bei den Kostmischungen B—D gesteigerte Menge Fäkalmagnesium im Verhältnis zu der bei Kost A ausgeschiedenen, so ist keine Steigerung des Magnesiumverlustes bei Einverleibung gerösteter Weizenkleie (Kost C) im Verhältnis zu dem Verlust bei einer Kost mit K. 97° (Kost B) festzustellen.

Berechnet man die gesteigerte Magnesiummenge, die dem Organismus bei den hier zugeführten Mengen K. 97° und K. 170° zugute kommt, so findet man diese mit 41% bzw. 47% des Magnesiumgehaltes der Kleie. Die wirkliche Resorption von Magnesium aus K. 97° nach Korrektion für den durch die Grundkost in Kost B sowie den durch die Zellulose der Weizenkleie verursachten Magnesiumverlust beträgt:

$$100 - \frac{[97 - (12 + 10)] \times 100}{144} = 48 \%$$

## 2. Die Calcium- und Magnesiumbilanz.

Der Mindestbedarf an Calcium beträgt bei einem Erwachsenen pro Tag 0,45 g (SHERMAN, 1920). LEITCH (1937) gibt diese Menge mit 0,55 g bei einem Alter von 24 Jahren und darüber an. Nach BRULL (1936) schwankt der Magnesiumbedarf pro Tag zwischen

fürhte Malonsäure praktisch vollständig umzusetzen vermag (Literatur siehe bei FLASCHENTRÄGER 1926, STÖHR 1938).

Ein Tier starb 35 Minuten nach intravenöser Injektion von Malonsäure 1,22 g/kg, wahrscheinlich nach geschwächter Herzleistung. Es wäre von Bedeutung festzustellen, dass die Steigerung der Bs-Konzentration im Blut nach Zufuhr von Malonsäure nicht auf einem verminderten Sauerstoffzufuhr an die Gewebe durch Herzdekompensation beruht. Deshalb wurde der Druck im rechten Vorhof während eines Malonatversuchs registriert. Intravenöse Injektion während 44 Minuten von 0,67 g Malonsäure/kg Körpergewicht hatte keinen Einfluss auf den Vorhofdruck. Die Bs-Konzentration im Blute stieg in der gleichen Zeit von 3 auf 22;Bs/ml Plasma.

*Nach den hier wiedergegebenen Versuchen ist es äusserst wahrscheinlich, dass normal in vivo eine starke Bs-Umsetzung stattfindet. Die Gewebe eliminieren wahrscheinlich selbst die dort gebildete Bs. Diese wird oxydativ umgewandelt, in erster Linie mit Hilfe der Succinodehydrogenase.*

### Bs-Bildung in verschiedenen Organen.

Bilden alle Gewebe des Körpers Bs oder dominiert ein besonderes Organ bei der Bs-Bildung? — Um dieses Problem zu lösen, kann man entweder unter Bs-Bildung die arterio-venöse Differenz verschiedener Organe feststellen oder die Bs-Bildung isolierter Organe im Perfusionsversuch studieren. In beiden Fällen muss die Bs-Elimination irgendwie gehemmt werden. In der folgenden Untersuchung wurde diese Hemmung durch verminderte Sauerstoffzufuhr herbeigeführt.

*Untersuchung der arterio-venösen Differenz:*

TABELLE 30.

Versuchster Nr.	γ Bs/ml Plasma			γ Citronensäure/ml Plasma	
	Blut aus Art. carotis, Normalwert	Blut aus Art. carotis, Anoxämiewert	Blut aus V. renalis, Anoxämiewert	Blut aus Art. carotis, Normalwert	Blut aus Art. carotis, Anoxämiewert
I	5	22	0	90	83
II	3	32	0		
III	0	43	0	72	73

Kaninchen in Urethan-Narkose. Technik bei Verminderung der Sauerstoffzufuhr siehe S. 96.

I. 2,1 kg. II. 1,5 kg. III. 1,55 kg.

Berechnet man die Mittelwerte und führt auch hier Vergleichszahlen ein, so ergibt sich eine leicht positive Bilanz bei Kost B und Kost C; zwei Versuchspersonen, die diese beiden Kostmischungen erhalten haben, zeigen positive, eine dritte dagegen negative Bilanz. Trotz der Erhöhung des Fäkal magnesiumgehaltes, die durch 30 g Weizenkleie bewirkt wird, scheint die Magnesiummenge in dieser Kleie praktisch auszureichen, um den Magnesiumbedarf des Körpers zu decken. Es lässt sich kein deutlicher Unterschied zwischen der Magnesiumbilanz bei Kost mit K. 97° und Kost mit K. 170° feststellen. Die Mittelwerte sprechen eher für bessere Ausnützung des Magnesiums aus der auf 170° erhitzten Weizenkleie im Vergleich zu K. 97°.

### Zusammenfassung.

Hinsichtlich des Calcium- und Magnesiumstoffwechsels beim Menschen finden wir:

1. Durch Zusatz von Kleie zur Kost wird der Abgang von Calcium mit den Faeces gesteigert. Diese Steigerung übertrifft die mit 30 g Weizenkleie einverleibte Calciummenge. Weizenkleie verursacht also, trotz ihres Gehaltes an Calciumsalzen, eine Verringerung der für den Organismus zur Verfügung stehenden Calciummenge, indem sie einen mit den Darmsäften gesteigerten Verlust an diesem Mineral bewirkt. Eine vorher negative Calciumbilanz wird durch kleiehaltige Kost noch negativer.

2. Der Magnesiumgehalt der Kleie ist bedeutend höher als ihr Calciumgehalt. Trotzdem der Magnesiumverlust mit den Faeces bei kleiehaltiger Kost zunimmt, bedeutet die Kleiekost, was das Magnesium anlangt, einen Gewinn für den Organismus. Der Magnesiumgehalt von 30 g Weizenkleie scheint den Bedarf des erwachsenen Organismus an diesem Mineral praktisch decken zu können.

3. Im Menschenversuch wird der Verlust von Calcium und Magnesium mit den Faeces durch Erhitzung der Kleie auf 170° nicht beeinträchtigt.

TABELLE 31.

Versuchstier Nr.	γ Bs/ml Plasma in Blut aus			
	Art. carotis, Normalwert	Art. carotis, „Anoxämiewert“	V. porta	V. hepatica
I	0	46	57	153
II	19	52	46	121
III	0	14	11	34
IV	—	16 <sup>1</sup>	30	53

Kaninchen in Urethan-Narkose. Die Blutprobe aus der Art. carotis („Anoxämiewert“), V. porta und V. hepatica wurden so schnell wie möglich nacheinander entnommen. Technik siehe S. 84. Die Blutprobe aus der V. hepatica wurde mit der von MÄRTENSSON (1940) angegebenen Methode entnommen.

Die *Leber* kann also bei verminderter Sauerstoffzufuhr Bs bilden.

*Perfusionsversuche:* Wir haben Perfusionsversuche mit isolierter Leber und Hinterkörper bei verminderter Sauerstoffzufuhr ausgeführt. Bezüglich der Perfusionstechnik siehe S. 85. Nach der „Stabilisierungsperiode“ wurde jede Sauerstoffdarreichung eingestellt. Gleichzeitig wurde das „Venenblut“ durch einen Trichter und ein Glasröhrchen direkt auf den Boden des Oxygenators geleitet. Allmählich nahm das Blut mehr und mehr eine venöse Färbung an. Nach einer gewissen Zeit (gewöhnlich nach 30—45 Min.) wurde das Sauerstoffgemisch wieder verabfolgt, so dass das Blut vollständig mit Sauerstoff gesättigt wurde. Dadurch wurde festgestellt dass das Organ auch nach der Anoxämie Sauerstoff verbrauchte und nicht während des Versuches irreversibel geschädigt worden war (siehe Tabelle 32).

Die *Leber* reagiert bei verminderter Sauerstoffzufuhr schnell mit Bs-Bildung. Wird die Perfusion nicht genügend schnell in Gang gesetzt, so findet man schon bei Beginn des Versuches im Perfusionsblut einen hohen Bs-Wert. Dies ist in dem ersten in der Tabelle 32 wiedergegebenen Versuche der Fall.

Aus den Versuchen geht hervor, dass die Bs-bildende

<sup>1</sup> Diese Probe wurde der rechten Herzkammer entnommen.

## Versuchsergebnisse und Besprechung.

Der nahrungsphysiologische Wert der Weizenkleie, soweit er ihren Gehalt an Stickstoffprodukten, Calcium und Magnesium betrifft, ist teils durch in vitro-Versuche, teils durch Versuche an Ratten und Menschen untersucht worden. Im Tierversuch wurde der Einfluss der Erhitzung auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt der Weizenkleie untersucht.

Als menschliche Nahrung dürfte Weizenkleie hauptsächlich als Bestandteil von aus Mehl hohen Ausmahlungsgrades gebackenem Brot Verwendung finden. Da die Temperatur beim Backen in der Krume 96—99° und in der Kruste des Brotes 150—180° erreicht, wurde in der Hauptsache Weizenkleie untersucht, die eine Stunde lang auf 97° und 170° erhitzt worden war. Die Zeit von einer Stunde wurde gewählt, da dies etwa der Backzeit eines mittelgrossen Brotes entspricht. Zum Vergleich mit der wärmebehandelten Kleie ist auch nicht-erhitzte Weizenkleie untersucht worden.

Die in vitro-Versuche, bei denen jedoch sowohl der Grad der Erhitzung als ihre Dauer innerhalb weiter Grenzen veränderlich war, bestätigen HEUPKES (1931) umstrittene Beobachtung, dass proteolytische Fermente in die Kleiezellen einzudringen und Stickstoffprodukte abzubauen vermögen. Aus Weizenkleie, die während einer Stunde auf 97° erhitzt worden war, liessen sich praktisch ebenso grosse Mengen Stickstoffprodukte mit Pepsin und Trypsin herauslösen, wie aus nicht wärmebehandelter Kleie. Auch verändert sich die auslösbare Stickstoffmenge nicht, wenn die Weizenkleie 4 Stunden lang auf 97° erhitzt wird. Durch lang anhaltende Verdauung mit Pepsin und Trypsin lassen sich annähernd 9/10 des Stickstoffs der Weizenkleie auslösen. Wird die Weizenkleie hingegen 1 Stunde lang auf 125° oder höhere Temperaturen erhitzt, so nimmt die Auslösbarkeit der Stickstoffprodukte ab; die Verdaulichkeit wird mit zunehmender Temperatur immer schlechter.

Fähigkeit der Leber annähernd gleich der des ganzen Tieres ist<sup>1</sup>.

Bei Leberperfusion ohne Beschränkung der Sauerstoffzufuhr wird keine Bs gebildet, sondern die Bs des Perfusionsblutes wird wahrscheinlich langsam eliminiert (siehe Tabelle 25, S. 91).

*Perfundierter Hinterkörper* bildet ebenfalls bei beschränkter Sauerstoffzufuhr Bs, doch in erheblich geringerer Menge als die Leber unter ähnlichen Versuchsbedingungen, siehe Tabelle 33. Bei Perfusion unter voller Sauerstoffzufuhr wird keine Bs gebildet.

*Von den Organen des Körpers bildet bei beschränkter Sauerstoffzufuhr die Leber wahrscheinlich die meiste Bs. Muskulatur hat unter diesen Versuchsbedingungen eine erheblich geringere Fähigkeit, Bs zu bilden. Die Nieren bilden wahrscheinlich keine Bs und ihre Bs-Elimination geht vermutlich unabhängig von der verminderten Sauerstoffzufuhr weiter.*

### Untersuchung der Bs-Umsetzung bei der Katze.

*Bs-Elimination:* Technik wie beim Kaninchen, siehe S. 84).

TABELLE 34.

Zeit in Minuten nach Beendigung der Bs-Injektion	γ Bs/ml Plasma in Arterienblut
Normalwert	0
1/2	306
12	35
23	0
41	0

Sämtliche Bs-Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Katze 2,1 kg, 75 mg Bs/kg Körpergewicht intravenös injiziert während 1 1/2 Minute.

Die Elimination der intravenös injizierten Bs erfolgt also schnell, mit ebenso grosser Geschwindigkeit wie beim Kaninchen.

<sup>1</sup> In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass TOENNISSEN u. BINCKMANS (1930) in ihren bereits erwähnten Perfusionsversuchen mit Kaninchenmuskulatur festgestellt haben, dass Bs-Bildung aus Brenztraubensäure nur bei beschränkter Sauerstoffzufuhr erfolgt.

schen Organismus fördern und den Stickstoff- und Calciumverlust mit den Faeces verringern.

Die in vitro-Versuche zeigten, dass Erhitzung der Weizenkleie auf über 125° die Verdaulichkeit der Stickstoffprodukte beeinträchtigte. Man weiss, dass Röstprodukte die Absonderung von Verdauungssäften steigern und die Peristaltik fördern, was ebenfalls zu einer schlechteren Ausnützung der Stickstoffprodukte der auf 170° erhitzten Weizenkleie beitragen und einen erhöhten Verlust von Calcium und Magnesium verursachen dürfte. Auch Zellulose steigert die mit den Faeces ausgeschiedene Calcium- und Magnesiummenge. Eine solche Steigerung war jedoch bei den Tierversuchen mit einer Kost von nicht wärmebehandelter Weizenkleie nicht festzustellen, wohl aber bei der gebackenen Kost. Bei einstündiger Erhitzung auf 170° wird eine nicht geringe Menge des Vitamins B<sub>1</sub> der Weizenkleie zerstört, und da wahrscheinlich dieses Vitamin — evtl. zusammen mit Vitamin B<sub>2</sub> — den Calciumverlust durch die Faeces verringert und die Ausnützung des Magnesiums im tierischen Organismus fördert, scheint eine Zerstörung von Vitamin B<sub>1</sub> bei Rösten und Backen zu dem erhöhten Verlust an diesen Mineralen bei Fütterung mit wärmebehandelter Kost beitragen zu können. Die grössere Zufuhr von Vitamin B mit der Weizenkleie würde dann erklären, weshalb bei einer Kost mit 35% nicht wärmebehandelter Weizenkleie der Verlust an Calcium und Magnesium mit den Faeces nicht zunahm.

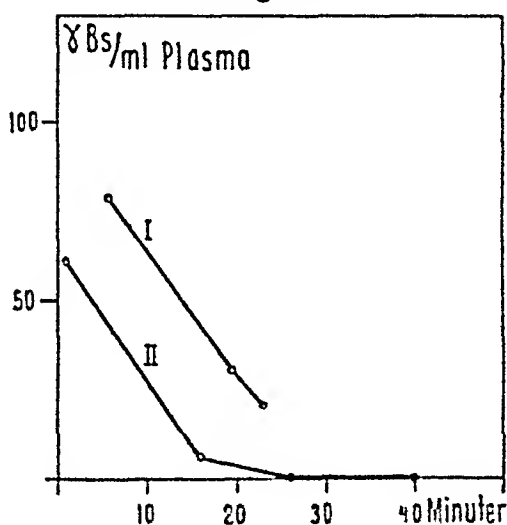
Es sind auch in vivo-Versuche an Menschen gemacht worden, um zu untersuchen, ob und in welchem Grade der menschliche Darmkanal Stickstoff, Calcium und Magnesium aus Weizenkleie auszunützen vermag. Die Versuchspersonen erhielten Weizenkleie in einer Menge entsprechend der in etwas über 200 g Vollkornbrot enthaltenen Kleie. In keinem Falle verursachte diese Kleiemenge Beschwerden seitens des Darmkanals bei den gesunden Versuchspersonen. Durch Weizenkleie, die 1 Stunde lang auf 97° erhitzt worden war, wurde dem menschlichen Organismus im Durchschnitt Stickstoff in einer Menge zugeführt, die etwa 75% des Stickstoffgehaltes der Kleie entsprach. Die Resorption des Stickstoffs aus dieser Kleie beträgt, unter Berücksichtigung des durch die Zellulose verursachten Verlustes, etwa 90%. Röstet man die Weizenkleie hingegen 1 Stunde lang bei 170°, so ergibt sich eine gesteigerte Stickstoffzufuhr mit der Weizenkleie, die nur etwa 30% des Stickstoffgehaltes der Kleie entspricht. Die



tion morgens und abends untersucht, teils nach Bs-Elimination und nach Anoxämie durch histologische Untersuchung feststellen lassen, in welcher Rhythmusphase die Leber sich am Schluss des Versuches befand<sup>1</sup>.

Die *Bs-Elimination* wurde an wachen Tieren ausgeführt. Gleiche Succinatmengen wurden mit gleicher Geschwindigkeit bei den Morgen- und Abendversuchen in eine Ohrenvene gespritzt. Die Blutproben wurden den Venen des andern Ohres entzogen. Die Eliminationsversuche morgens und abends wurden am gleichen Kaninchen ausgeführt, wobei zwischen den beiden Versuchen mindestens 25 Tage verstrichen. Als Beispiel sei der nachstehende Versuch angeführt.

Fig. 12

Fig. 12. *Bs-Elimination und Tagesrhythmus.*

Kaninchen 6,2 kg., nicht narkosiert. 25,4 mg. Bs pro kg. Körpergewicht intravenös während 3 Minuten injiziert.

- I. Succinatinjektion vormittags; 10,45—10,49 Uhr.  
 II. „ „ nachmittags; 18,44—18,47 Uhr.

Es scheint, als ob die *Bs-Elimination* nachmittags etwas schneller vor sich ginge (der *Dissimilationsphase* der Leber entsprechend). Der Unterschied ist jedoch nicht gross.

<sup>1</sup> Die histologische Untersuchung hat Dozent Hjalmar Holmgren am Karolinischen Institut, Stockholm, ausgeführt, wofür ich ihm sehr zu Dank verpflichtet bin.

an diesem Vitamin keine Bedeutung haben kann. Die Versuchsdauer ist ausserdem kurz. Evtl. könnten diese Umstände den letztgenannten Unterschied zwischen den beiden Serien von in vivo-Versuchen erklären.

Bleibt die Frage: Soll die Weizenkleie als Bestandteil der menschlichen Nahrung empfohlen werden? Die Diskrepanz zwischen den Tier- und Menschenversuchen in bezug auf die Ausnützung des Calciums aus der Weizenkleie macht die Antwort, soweit es dieses Mineral betrifft, sehr schwierig. Eine Calciumquelle von wesentlicher Bedeutung kann die Weizenkleie mit ihrem verhältnismässig geringen Calciumgehalt jedenfalls nicht sein. Andererseits ist, wenn man die Ergebnisse der Menschenversuche betrachtet, der durch die Weizenkleie verursachte Calciumverlust ziemlich geringfügig. Was das Magnesium betrifft, so sprechen die Versuche eindeutig dafür, dass der Organismus dieses Mineral in beträchtlichem Grade aus Weizenkleie sich nutzbar machen kann. Was wiederum die Stickstoffprodukte angeht, so zeigen die Rattenversuche, dass aus nicht wärmebehandelter Weizenkleie dem tierischen Organismus eine erhebliche Menge Stickstoff zugeführt wird. In den Menschenversuchen kann man dasselbe für Kleie feststellen, die 1 Stunde lang auf  $97^{\circ}$  erhitzt worden ist. Die Resorption beläuft sich auf etwa 90% des Kleiestickstoffs und ist bedeutend grösser als der durch die Kleie verursachte Stickstoffverlust mit den Faeces. Sowohl die Menschen- als die Tierversuche zeigen eine merkbare Zunahme des Fäkalstickstoffs, wenn der Kost Weizenkleie beigegeben wird, die 1 Stunde lang auf  $170^{\circ}$  erhitzt worden ist. Auch scheinen die aus dieser Weizenkleie resorbierten Stickstoffprodukte sich schlecht als Bausteine im menschlichen Organismus zu eignen. Die Stickstoffprodukte der während 1 Stunde auf  $97^{\circ}$  erhitzten Weizenkleie hingegen scheint der Mensch gut auszunützen. Sowohl im Tier- als im Menschenversuch werden dem Organismus bei Kleiekost Stoffe in einem Ausmass zugeführt, das die Hälfte des Gesamtgewichtes der Kleie übersteigt. Schliesslich enthält die Weizenkleie ansehnliche Mengen Vitamin B. Die Tierversuche sprechen dafür, dass eine reiche Einverleibung von Vitamin  $B_1$  und  $B_2$  — oder eines derselben — sowohl für die Ausnützung der Gesamtkost als des Stickstoffs, des Calciums und des Magnesiums von Bedeutung ist. Da nach ABRAMSONS (1938) Untersuchung die Ernährung des schwedischen Volkes einen recht

TABELLE 37.

Kaninchen Nr. 65		Kaninchen Nr. 66	
Zeit in Minuten, nach Beendigung der Drosselung der Sauerstoffzufuhr (während 1 1/2 Minute)	γ Bs/ml Plasma in Arterienblut	Zeit in Minuten, nach Beendigung der Drosselung der Sauerstoffzufuhr (während 2 Minuten)	γ Bs/ml Plasma in Arterienblut
Normalwert	11	Normalwert	0
1/2	18	1/2	6
11,5	11	10	16
22	67	22,5	16
32,5	122	35,5	108
36,5	150	38	121

Kaninchen 66. Glykogenarme Leber. Das Glykogen liegt in den Zellen, welche die zentrale Zone der Leberlobuli bilden. Diese Zellen enthalten nur spärliche Glykogenmengen. Die peripheren Zellen sind in der Regel leer oder enthalten nur wenige Glykogenkörnchen. Verschiedene Zellen enthalten Vakuolen, vermutlich nach ausgelöstem Fett. Stadium: Dissimilationsphase mit Glykogenschwund.

*Die histologische Untersuchung der Leber hat gezeigt, dass die Rhythmuslage der Leber für die Elimination und die Bildung der Bs keine wesentliche Bedeutung hat. Bs-Eliminationsversuche an wachen Tieren zeigen jedoch, dass die Elimination vermutlich nachmittags etwas schneller vor sich geht als vormittags.*

### Besprechung der Ergebnisse.

Der Organismus kann ihm zugeführte Bs schnell umsetzen, wie aus den Bs-Eliminationsversuchen hervorgeht. Versuche dieser Art („Belastungsversuche“) geben jedoch keine Auskunft darüber, ob eine Umsetzung von Bs normal wirklich stattfindet.

Indem man die Fähigkeit des Organismus, Bs umzusetzen, hemmt, kann man eine Steigerung des Bs-Gehaltes im Blute (und in den Geweben) hervorrufen. Dies macht es *wahrscheinlich, dass normal in vivo Bs umgesetzt wird*. Bei den hier herrschenden Versuchsbedingungen ist die Bs-Bildung am stärksten in der Leber, weniger stark in der Muskulatur. Die Nieren bilden vermutlich keine oder nur geringfügige Mengen Bs.

Ist die Bs hier ein Metabolit oder ein Katalysator nach Szent-Györgyis C<sub>4</sub>-Säurentheorie? — Wird die Bs-Elimination durch

## Zusammenfassung.

Wie aus der Einleitung und dem dort gegebenen geschichtlichen Überblick hervorgeht, zeigen die früheren Untersuchungen über den Nährwert der Kleie in verschiedener Hinsicht widersprechende Ergebnisse sowohl in bezug auf die Ansützung des Kleieeiweisses als in bezug auf den Einfluss der Rohfaser auf die Verdauungsarbeit und die Resorption der für den Organismus verwertbaren Bestandteile der Kleie. Die mineralischen Bestandteile des Weizenkornes sind hauptsächlich an die Kleie gebunden. Im übrigen sind die Vitamine der B-Gruppe sowie die Eiweissstoffe die wertvollsten Bestandteile der Kleie. Da sowohl Vitamin B<sub>1</sub> als die Eiweissstoffe durch Erhitzung — also auch beim Backen — beeinflusst werden, wurde das Hauptgewicht der vorliegenden Arbeit auf eine vergleichende Untersuchung betreffend die Ausnützung der genannten Kleiebestandteile teils bei Verwendung nicht wärmebehandelter Kleie, teils während 1 Stunde auf 97° bzw. 170° erhitzter Kleie gelegt. Die Verdaulichkeit der Stickstoffprodukte der Kleie sowie der Minerale Calcium und Magnesium ist durch in vitro-Versuche bei 37° untersucht worden. Durch Versuche an Ratten wurde der Einfluss der Weizenkleie auf Wachstum, Fäkalbildung sowie auf den Stickstoff-, Calcium- und Magnesiumstoffwechsel untersucht. Die Versuche sind ergänzt worden durch Untersuchungen an erwachsenen Menschen über den Einfluss der Kleie auf die Fäkalbildung sowie auf den Stickstoff-, Calcium- und Magnesiumstoffwechsel des Menschen.

Die Untersuchung hat in der Hauptsache folgende Resultate geliefert.

### Kap. I. VERDAUUNGSVERSUCHE IN VITRO.

#### I A. Die Auslösbarkeit der Stickstoffprodukte aus Weizenkleie.

Die Verdauungsversuche wurden bei 37° mit nicht wärmebehandelter sowie während 1 Stunde auf 97° bzw. 170° erhitzter Weizenkleie ausgeführt.

Man findet die beste Verdauung in alkalischem Milieu und eine bedeutende Steigerung bei Zusatz von Enzym. Letzteres zeigt, dass die *Enzyme die Wandungen der Kleiezellen zu durchdringen* vermögen. Durch Verdauung mit Magensaft und anschließende Verdauung mit Duodenalsaft werden aus nicht wärmebehandelter Weizenkleie nicht weniger als 70 % der Stickstoffprodukte ausgelöst.

zunächst der Lösung harren, sind: Aus welchen Stoffen wird Bs normal gebildet, und welche Stoffe entstehen bei der Elimination der Bs? Diese Probleme werden den Gegenstand fortgesetzter Untersuchungen bilden.

Es ist bemerkenswert, mit welcher Geschwindigkeit Bs bei Anoxämie- und Malonatversuchen ins Blut diffundiert, und zwar sowohl bei Versuchen am ganzen Tier als an isolierter Leber. Aber Bs diffundiert sehr langsam in die Leber und wird hier auch sehr langsam umgesetzt. Dies spricht nicht dafür, dass normal in diesem Organ eine starke Bs-Umsetzung stattfindet (nach den Anoxämieversuchen). Der normale Bs-Gehalt des Blutes der *V. hepatica* ist gleich dem des Blutes, das der Leber zugeführt wird. Perfundierte Leber bildet bei genügender Sauerstoffzufuhr keine Bs. Dies deutet an, dass das Lebergewebe normal alle in der Leber gebildete Bs umzusetzen vermag. — Die Ursache des festgestellten „Missverhältnisses“ zwischen der starken Bs-Bildung und der geringen Bs-Elimination der Leber ist nicht bekannt. Diese Frage muss einstweilen offen bleiben.

Es war von vornherein *wahrscheinlich, dass eine Bs-Umsetzung auch bei anderen Tieren als Kaninchen stattfindet*, da der intermediäre Stoffwechsel der Säuger im grossen ganzen derselbe ist. Eine Bs-Umsetzung des oben geschilderten Typs ist bei der Katze festgestellt worden. Entsprechende Versuche am Menschen auszuführen, ist nicht leicht. In Anbetracht der stark geschwächten Herzleistung, die bei den Kaninchen nach Zufuhr grosser Dosen Bs und Malonsäure festzustellen war, dürften solche Stoffwechselversuche für die Versuchspersonen nicht ganz gefahrlos sein. Statt dessen sind Bs-Bestimmungen im Blut von einigen Patienten mit solchen Krankheiten gemacht worden, bei denen nach den Ergebnissen der Tierversuche eine Hemmung der Bs-Elimination zu erwarten war. Ein erhöhter Bs-Gehalt dieses Blutes hat nicht festgestellt werden können. Doch schliessen diese negativen Befunde die Möglichkeit einer normal stattfindenden Bs-Umsetzung auch beim Menschen nicht aus. Die ausgebliebene Bs-Zunahme beispielweise bei Herzdekompensation kann sich so erklären, dass die Anoxämie nicht genügend hochgradig war, um einen gesteigerten Bs-Gehalt des Blutes zu bewirken. Die Bs-Umsetzung beim Menschen wird daher weiter untersucht werden. (Die ausgeführten Bs-Bestimmungen werden deshalb hier nicht näher erörtert.)

Eine Vergleichskost gibt an und für sich ein gutes Wachstum und schöne Tiere. Ein Sonderzuschuss von Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> zur Kost steigert jedoch das Wachstum der Tiere. Auch ein Zusatz von 2,1% Rohfaser zur Vergleichskost verbessert das Wachstum. Bei einer Kost mit 35% Weizenkleie ist das Wachstum der Tiere ebensogut wie bei den beiden letztgenannten Kostmischungen, also besser, als bei der Vergleichskost. Man erhält grosse Tiere von ausgezeichneter Kondition. Wird die der Kost beigegebene Weizenkleie erhitzt oder die ganze Kost gebacken, so verschlechtert sich das Wachstum der Tiere.

## II B. Bilanzversuche.

Sämtliche in den Wachstumsversuchen verwendeten Tiere wurden im Alter von 25 Wochen in Bilanzversuche eingesetzt. Nachdem die Tiere 2 Wochen lang an die Versuchsbedingungen gewöhnt worden waren, wurden 4wöchige Stoffwechselversuche ausgeführt, also an 27—31 Wochen alten Tieren, die vor Beginn des Versuchs 23 Wochen mit der betreffenden Kost gefüttert worden waren. Es wurden folgende Feststellungen gemacht:

1) Ein Zusatz von 2,1% Faser zur Vergleichskost erhöht die Nahrungsaufnahme pro g Körpergewicht nicht. Die mit Faserkost gefütterten Tiere sind während des Wachstumsversuchs besser gewachsen; sie sind bei dem Bilanzversuch grösser als die mit der Vergleichskost gefütterten Tiere und fressen daher absolut mehr.

2) Wird der Vergleichskost zusätzliches Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> beigegeben, so nehmen die Tiere pro g Körpergewicht eine kleinere Nahrungsmenge auf, wachsen aber während des Bilanzversuchs trotzdem ebenso gut wie die mit der Vergleichskost gefütterten Tiere und haben ein ebenso hohes Körpergewicht wie die Tiere, welche die Kost mit Faserzusatz erhalten. *Die Vitamine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> — oder eines von ihnen — begünstigen also die Ausnützung der Nahrung.*

3) Ebenso hohes Körpergewicht und gleich gutes Wachstum während des Bilanzversuchs wie mit den Kostmischungen mit Faser- und Vitamin-B-Zusatz erhält man durch Beimischung von 35% Weizenkleie zur Kost. Die Nahrungsaufnahme pro g Körpergewicht nimmt jedoch stark zu.

4) Die ausgeschiedenen Fäkalien wurden gesammelt und bei 105° bis zum Eintreten des konstanten Gewichtes getrocknet. Die Menge Fäkalien wird in Prozent der aufgenommenen Nahrungsmenge angegeben. Die Kotmenge wird durch Zusatz von Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> nicht beeinflusst. Ein Zusatz von Faser zur Kost steigert die Menge der Fäkalien. Diese Steigerung ist prozentual etwas grösser, als es dem Faserzusatz entspricht. Versetzt man die Kost mit Weizenkleie, so steigt die Kotmenge erheblich mehr an, als es dem Fasergehalt der Kleie entspricht. Backen der Kleiekost hat eine weitere Steigerung der Kotmenge im Gefolge. Röstprodukte regen die Saftsekretion an und befördern die Peristaltik.

*Kapitel IV.* Die geeignetste Dosierung der Bs für die Untersuchung ihrer Umwandlung in vivo ist ermittelt worden. Kleinere Bs-Mengen, durch intravenöse Injektion einverleibt, verstärken die Atmung ein wenig, ohne den arteriellen und venösen Druck zu beeinflussen. Grössere Mengen Bs dagegen schwächen die Herztätigkeit, setzen den arteriellen Druck herab und steigern den Venendruck (siehe Fig. 7, S. 81).

*Kapitel V.* Methodik: Die Versuche wurden an ganzen Tieren und an isolierten Organen im Perfusionsverfahren ausgeführt. Als Versuchstiere dienten hauptsächlich Kaninchen.

**Bs-Elimination:** Der Organismus vermag ihm durch intravenöse Injektion einverleibte Bs schnell zu eliminieren. Diese Bs-Elimination vollzieht sich zum grössten Teil durch Umsetzung der Bs in den Nieren (siehe Fig. 9, S. 92, Tabelle 26, S. 93). Nur höchstens 5 % der zugeführten Menge werden mit dem Harn ausgeschieden.

**Bs-Bildung:** Wird die Elimination der Bs durch Drosselung der Sauerstoffzufuhr oder durch Einverleibung von Malonsäure gehemmt, so lässt sich Bs-Bildung in vivo nachweisen (siehe Fig. 10 u. 11, S. 96 u. 97). Am stärksten ist sie in der Leber, weniger stark in der Muskulatur. In den Nieren wird bei Anoxämie wahrscheinlich keine oder nur sehr wenig Bs gebildet. Die Nieren dürften vermutlich unter diesen Versuchsbedingungen sogar Bs eliminieren können.

**Schlussfolgerung:** *Es findet wahrscheinlich normal in vivo eine Umsetzung von Bs statt. Die Bs ist dabei ein Metabolit.* Die Untersuchung hat nichts ergeben, was dafür spräche, dass Bs als Katalysator nach SZENT-GYÖRGYIS C<sub>4</sub>-Säuren-Theorie fungiert. Durch die Ergebnisse wird die Möglichkeit eines Citronensäurezyklus nach KREBS in vivo weder bestätigt noch bestritten.

Der Tagesrhythmus ist für die Bs-Umsetzung vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

**Die Bs-Umsetzung anderer Säuger:** Eine Bs-Umsetzung vom gleichen Typus wie beim Kaninchen ist auch bei der Katze festgestellt worden. Tatsachen, die anzeigten, dass die Umwandlung von Bs beim Menschen in gleicher Weise vor sich geht, liegen bisher noch nicht vor. Die diesbezüglichen Untersuchungen werden fortgesetzt.

## II C. Der Einfluss der Erhitzung auf das Vitamin B<sub>1</sub> der Weizenkleie.

Durch Wachstumsversuche an jungen Ratten ist gezeigt worden, dass das Vitamin B<sub>1</sub> der Weizenkleie durch einstündige Erhitzung auf 97° nicht zerstört wird. Erhitzt man hingegen die Weizenkleie eine Stunde lang auf 170°, so wird  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  der ursprünglichen Vitamin-B<sub>1</sub>-Menge der Kleie zerstört.

## Kap. III. VERSUCHE AN MENSCHEN.

Um eine Bestätigung dafür zu erhalten, ob die in den Tierversuchen gemachten Feststellungen auf den Menschen Anwendung finden können, sind Versuche an 4 erwachsenen Menschen, 2 Männern und 2 Frauen, ausgeführt worden.

Bei diesen Versuchen an Menschen hat kein Unterschied zwischen der Steigerung der Fäkalienmenge festgestellt werden können, die durch 1 Stunde lang auf 97° erhitzte Kleie bzw. ebensolange auf 170° erhitzte verursacht wird. Weizenkleie, die mit Pepsin und Trypsin auf 40 % der ursprünglichen Menge verdaut worden ist, ergibt im Mittel eine Steigerung der Fäkalienmenge, die nur um 8 % hinter der durch die entsprechende Menge nicht verdaute Weizenkleie verursachten zurückbleibt. *Bei Verzehrung von Kleie wird also die Steigerung der Fäkalienmenge zum grössten Teil durch die Zellulose der Kleie bestritten.*

Hinsichtlich des Stickstoffumsatzes ergibt sich folgendes:

1) Durch Zufuhr von 30 g auf 97° erhitzte Kleie pro Tag wird die Ausscheidung von Stickstoffprodukten mit den Faeces gesteigert. Wird diese Kleie gegen in vitro verdaute Kleie vertauscht, die nur noch 10 % der Stickstoffprodukte enthält, so liefert diese Kleie einen ebenso hohen Stickstoffverlust mit den Faeces, wie die unverdaute Kleie. Die Zellulose der Kleie bewirkt also einen erhöhten Verlust an Fäkalstickstoff, der von den Verdauungssäften stammt. Die Resorption der Stickstoffprodukte aus der Kleie ist jedoch grösser als die durch die Zellulose der Weizenkleie verursachte Steigerung des Fäkalstickstoffs.

2) Bei Einnahmen von 30 g Weizenkleie, die 1 Stunde lang auf 97° erhitzt worden war, beträgt die Resorption 88 % der darin enthaltenen Stickstoffmenge.

3) Der von den Röstprodukten aus auf 170° erhitzter Weizenkleie verursachte Stickstoffverlust mit den Faeces ist grösser als der durch die Kleiezellulose bewirkte Stickstoffverlust.

4) Bei einer Grundkost von Sahne und Zucker ist die Stickstoffzufuhr absichtlich gering. Die Versuchspersonen zeigen eine negative Stickstoffbilanz. Die Zufuhr der Kleiezellulose führt keine Änderung der Stickstoffbilanz herbei. Bei gesteigertem Bedarf an Stickstoff für die Verdauungssäfte nimmt also die Stickstoffausscheidung mit dem Harn entsprechend ab. Eine Zufuhr von 30 g von auf 97° erhitzter Kleie pro Tag verbessert die Stickstoffbilanz. Bei Zufuhr gerösteter Kleie dagegen



leucomethylene blue as hydrogen donor. — Malonic acid inhibits the succinic acid dehydrogenation and fumaric acid hydrogenation, both to the same extent (see Fig. 5 and 6, p. 76 and 77).

Chap. IV. The most suitable dose of succinic acid for the examination of its metabolism *in vivo* has been found. Smaller quantities of succinic acid given by intravenous injections somewhat increase breathing without affecting the pressure in arteries or veins. Whereas larger quantities of succinic acid lower the function of the heart, reducing the arterial and increasing the venous pressure (see Fig. 7 p. 81).

Chap. V. *Method*: The experiments have been carried out on entire animals and on isolated organs as perfusion experiments. The animals experimented on were chiefly rabbits.

*Elimination of succinic acid*: The organism can quickly eliminate intravenously administered succinic acid. This elimination is chiefly due to metabolism in the kidneys (see Fig. 9 p. 92, Table 26, p. 93). Only 1—5 % of the succinic acid administered is secreted in the urine.

*The formation of succinic acid*: If the normal elimination of succinic acid is inhibited by reducing the oxygen conveyed or by administering malonic acid, the production of succinic acid *in vivo* can be proved (see Fig. 10 and 11 p. 97—98). This is greater in the liver, less in the muscles. When the oxygen administered is decreased no succinic acid, or hardly any, is formed in the kidneys. The kidneys can probably even eliminate succinic acid under these experimental conditions.

*Conclusion*: *In vivo* a metabolism of succinic acid probably normally takes place. Succinic acid is on these occasions a metabolite. In this research no support has been found of Szent-Györgyi's theory that succinic acid should act as catalyst. The results can neither confirm nor contest the possibility of a citric acid cycle *in vivo*.

*The daily rhythm* is probably of small consequence for the succinic acid metabolism.

*The succinic acid metabolism in other mammals*: Succinic acid metabolism of the same type as in rabbits has also been found in cats. No facts have yet been found tending to show that metabolism of succinic acid takes place in the same way in human beings. The examination of this is being continued.

Calciums und des Magnesiums der Kost von Bedeutung sind. Die Röstprodukte, die bei Erhitzung der Kleie (und des Brotes) auf hohe Temperatur entstehen, verschlechtern die Verdaulichkeit der Stickstoffprodukte der Kleie und steigern den Verlust an Stickstoff, Calcium und Magnesium mit den Faeces durch vermehrte Ausscheidung von Verdauungssäften. Die Stickstoffprodukte scheinen auch nach den Menschenversuchen bei Erhitzung auf 170° weniger wertvoll als Bausteine des Organismus zu sein.

## Summary.

As is shown in the Introduction and the historical review given there, previous investigations on the nutritive value of bran have yielded conflicting results on many points respecting the body's utilization of the protein of bran and the influence of the crude fibre on the work of digestion and absorption of the bran constituents that are of value to the body. The greater part of the mineral contained in the grain of wheat is confined to the bran. Of the other constituents of wheat bran, the vitamins of the group B and the proteins are the most valuable. Since both vitamin B<sub>1</sub> and the proteins are affected by heating — thus also by baking —, the present work is mainly devoted to a comparative study of the utilization of the bran constituents mentioned when derived from bran untreated with heat, bran treated with heat for one hour at 97° and 170° respectively. The digestibility of the nitrogenous substances and the minerals calcium and magnesium contained in bran has been studied by in vitro experiments at 37°. By experiments on rats an investigation has been made into the influence exercised by wheat bran on growth, formation of faeces, and the metabolism of nitrogen, calcium and magnesium. These experiments have been supplemented by others on human adults to study the influence of bran on the formation of faeces as well as on the nitrogen, calcium and magnesium metabolism in man.

The main results of the investigation are as follows.

### Chapter I. DIGESTION EXPERIMENTS IN VITRO.

#### I A. *The Extractability of Nitrogenous Substances from Wheat Bran.*

The digestion experiments have been carried out at 37° with wheat bran untreated with heat and treated with heat for one hour at respectively 97° and 170°.

Digestion was found to be best in an alkaline medium and to increase considerably on addition of enzyme. This latter fact shows that the *enzymes are able to penetrate through the walls of the bran-cells.* Digestion with gastric juice followed by digestion with duodenal juice extracts from non-heated wheat bran not less than 70 per cent of the nitrogenous substances contained in it.

Further digestion experiments under altered experimental conditions showed that wheat bran which has been heated at 97° or lower temperatures for one hour loses practically none of its nitrogenous digestibility. After four hours' heating at 97° the digestibility is still unchanged. On the other hand, heating at 125° or higher temperatures for one hour substantially reduces the digestibility.

The effect of pepsin and trypsin sets in very rapidly. In the case of digestion with a constant amount of digestive juice this rapid liberation of the nitrogenous substances proceeds at a declining rate during the first half-hour, subsequently becoming increasingly slower.

The breakdown products of the proteins check the proteolytic activity of the enzymes. Prolonged digestion under ideal conditions with constantly renewed digestive juices, first pepsin-hydrochloric acid, then trypsin-sodium bicarbonate solution, releases 60 per cent of the total quantity of bran and 88 per cent of the original amount of nitrogen.

Digestion experiments with pepsin-hydrochloric acid and trypsin-sodium bicarbonate solution respectively have also been conducted with wheat gluten. With both peptic and tryptic digestion the digestibility is, broadly viewed, equally good for the wheat gluten whether non-heated or heated at 97° for one hour. Heating at 170° for one hour, however, greatly reduces the digestibility of wheat gluten.

#### I B. *The Extractability of Calcium and Magnesium from Wheat Bran.*

By dialyzing wheat bran with a frequently changed dialyzing fluid of suitable acidity practically 100 per cent of the bran's calcium and magnesium compounds can be released. The extractability of these minerals is entirely dependent on the hydrogen-iron concentration of the solvent, and rises with this. The proteolytic enzymes exercise no influence here. Nor is the extractability lowered by heating the bran. Calcium and magnesium are extracted as readily from bran heated at 170° as from non-heated bran.

## Chapter II. ANIMAL EXPERIMENTS.

### II A. *Growth Experiments.*

Young rats, one month old, fed on wheat bran alone, all died within five weeks. Of four six-month old animals kept on this diet, the males died in 13 and 18 weeks respectively while the females are still alive after 25 weeks.

Addition of 1 per cent of cod-liver oil raises the nutritional value of wheat bran so much that young female rats can be reared to mature age on it without any other addition. They remain however small and barren.

A comparison diet gave good growth and fine animals. An addition of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> to the fare, however, was found to increase the

growth of the animals. Supplementing the comparison diet with 2.1 per cent of cellulose fibres also improves the growth. On a fare containing 35 per cent of wheat bran the growth of the animals is as good as on the two last-mentioned diets, and hence better than on the comparison diet. Large animals of excellent physique are obtained. If the wheat bran added to the fare is heated, or the whole ration is baked, the growth of the animals will be impaired.

## II B. *Balance Experiments.*

All the animals used in the growth experiments were transferred at an age of 25 weeks to the balance experiments. After the animals had been accustomed for two weeks to the experimental conditions, metabolic experiments were conducted for four weeks, i. e. on 27—31 week-old animals that had been fed on the respective diets for 23 weeks before the balance experiments were commenced. The following observations were made.

1) Addition of 2.1 per cent of fibres to the comparison diet does not increase the absorption of the food per g. of body weight. Animals fed on fibre-fare grow better during the growth experiment; at the balance experiment they are bigger than the animals fed on the comparison diet and therefore eat definitely more.

2) Following an extra supply of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> to the comparison diet the animals consume a smaller amount of food per g of body weight, but in spite of this they grow as well during the balance experiment as they have grown on the comparison diet, and have as high a body weight as they have on the diet with an addition of fibre. Hence the *vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>* — or one of them — *promote the utilization of the food.*

3) The introduction of 35 per cent of wheat bran into the diet results in as high a body weight and as good a growth during the balance experiment as is obtained on diets with extra fibres and extra vitamin B. The food intake per g of body weight, however, increases considerably.

4) The faeces voided were collected and dried to constant weight at 105°. The faecal output is given in percentages of the food intake. It is not influenced by further addition of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. Addition of fibre increases the quantity of faeces. This increase is proportionally somewhat greater than that represented by the fibre addition. Supplementation of the fare with wheat bran increases the quantity of faeces considerably more than corresponds to the fibre content of the bran. Baking the bran diet brings about a still further increase in the quantity of faeces. Roasted products stimulate secretion of juice and promote peristalsis. A part of the increased quantity of faeces is considered to be derived from the digestive tract.

5) At least 60 per cent of the wheat bran is absorbed in the intestinal canal.

With regard to the nitrogenous metabolism the following results were obtained.

1) Of the nitrogenous substances from non-heated wheat bran, at least 60 per cent is absorbed. Hence the absorption of nitrogenous substances is of the same order as the absorption of total bran. The bran causes a considerable nitrogenous increase in the faeces, partly on account of increased nitrogen from the digestive secretions. Proportionally, as large a part of the bran nitrogen is absorbed, whether the bran admixture to the food is large or small. When fed solely on wheat bran + 1 per cent of cod-liver oil the animals retain 30 per cent of the nitrogen supplied, although the nitrogen in the faeces amounts to 40 per cent of the same quantity. Hence a large output of nitrogen by way of the faeces is compatible with high nitrogen retention.

2) Increased intake of vitamin B seems to promote the body's utilization of the nitrogenous substances and to lower the quantity excreted in the faeces.

3) Roasting of the bran or baking of the whole ration substantially increases the faecal output of nitrogen. This increased output is probably due to several factors, viz.

a) Impaired digestibility of the heated nitrogenous substances (Cf. Chapter I).

b) Destruction of vitamin B<sub>1</sub>.

c) Increased loss of nitrogen through an augmented secretion of intestinal juice incited by roasted products.

Respecting the calcium and magnesium metabolism the experiments brought out the following points.

1) Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> — or one of them — reduce the output of calcium in the faeces.

2) Addition of fibre in all probability increases the faecal output of calcium. The unfavourable influence of the bran-fibres in this direction is however more than counterbalanced by the vitamin B of the bran, so that a diet containing 35 per cent of wheat bran gives the same calcium output by way of the faeces as one without fibres but with a high addition of vitamin B.

3) A diet with a high content of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> increases the amount of magnesium stored up in the skeleton.

4) On a diet containing 35 per cent of wheat bran the percentage loss of magnesium with the faeces is not larger than that on a fibreless fare with a high addition of vitamin B.

5) Baking the food at 170° for one hour increases the faecal output of calcium and magnesium, probably on account of increased secretion of digestive juices.

II C. *The influence of heating on Vitamin B<sub>1</sub> of bran.*

Growth experiments on young rats have shown that the Vitamin B<sub>1</sub> in wheat bran is not destroyed on heating the bran for one hour at 97°. On the other hand, a heating of the wheat bran at 170° for the same time destroys 1/3—1/2 of the original amount of vitamin B<sub>1</sub> in the bran.

## Chapter III. EXPERIMENTS ON MAN.

In order to ascertain whether the results attained in the animal experiments can be applied to human beings, a series of experiments have been conducted on four healthy human adults, two males and two females.

In these experiments on human subjects no difference was found between the increase in the quantity of faeces whether the wheat bran was heated for one hour at 97° or at 170°. Wheat bran that has been digested with pepsin and trypsin to 40 per cent of its original quantity gives, on an average, a faecal increase that only falls by 8 per cent below that caused by an equivalent amount of undigested wheat bran. *Hence it is the cellulose of the ingested bran that is responsible for the major part of the increase in the amount of faeces.*

With regard to the nitrogenous metabolism the following results were obtained.

1) Intake of 30 g per day of bran heat-treated at 97° increases the excretion of nitrogenous products in the faeces. If this bran is replaced by in vitro digested bran in which only 10 per cent of the nitrogenous substances of the bran is still left, this product gives as high a nitrogen output in the faeces as the undigested bran. Hence the cellulose of the bran causes an increased faecal output of nitrogen derived from the digestive fluids. The absorption of the nitrogenous substances from the bran is none the less larger than the increased rise in faecal nitrogen caused by the cellulose of wheat bran.

2) On ingestion of 30 g of wheat bran that has been heated at 97° for one hour the absorption amounts to 88 per cent of its content of nitrogen.

3) The faecal output of nitrogen caused by roasted products out of wheat bran heated at 170° is larger than the nitrogenous output caused by bran cellulose.

4) On a basic diet of cream and sugar the amount of nitrogen supplied was intentionally small. The experimental subjects exhibited a negative nitrogenous balance. No change of this balance was induced by administering bran cellulose. Thus, in the presence of increased nitrogen needs for the digestive juices, the elimination of nitrogen by way of the urine diminishes in a corresponding degree. A supply of 30 g per day of bran heated at 97° improves the nitrogenous balance. If roasted bran is supplied, however, the nitrogenous equilibrium is impaired, although some of the nitrogenous substances of the bran is absorbed. Roasting the bran at 170° for one hour causes not only an additional faecal output

of nitrogen but also a change in the nitrogenous substances, whereby these appear to become less suited for building up substance proper to the body.

Regarding the calcium and magnesium metabolism the following results were recorded.

1) Addition of bran is followed by increased elimination of calcium in the faeces. The increase in faecal calcium is greater than the quantity of calcium supplied with 30 g of wheat bran. Hence wheat bran, in spite of its content of calcium salts, causes a reduction of the quantity available for the body, this being due to an increased loss of the material with the intestinal juices. A previously negative calcium balance becomes more negative following an addition of bran.

2) The magnesium content of bran is considerably higher than its calcium content. Although the magnesium level in the faeces rises after an intake of bran, this does not imply a gain of magnesium for the body. The amount of magnesium in 30 g of wheat bran seems, practically speaking, to meet the adult body's requirements of this mineral.

3) The output of calcium and magnesium by way of the faeces was not increased in the experiments on man by heating the bran at 170°. This contrast to the results from the animal experiments is probably to be accounted for by the destruction of vitamin B<sub>1</sub> at the heating. In the human experiments the vitamin-B<sub>1</sub> content of the bran plays a less important part when the basic fare has been given an extra quantity of this vitamin.

In view of the results set forth above, wheat bran can be recommended as an ingredient of human food in the form of wholemeal bread baked at the lowest possible temperature (preferably in moulds over a water bath). From wheat bran which has not been heated to 100°, about 90 per cent of the nitrogenous substances is absorbed. In the animal as well as the human experiments, the body, when fed on a bran-containing diet, was supplied with substances exceeding half the total weight of the bran. Wheat bran contains considerable quantities of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. With an otherwise vitamin-poor diet a bran-containing bread ought in this respect to constitute a valuable contribution to the fare. Above all, an ample supply of vitamin B<sub>1</sub> is necessary in diets having a high carbohydrate content such as just bread and meal. The results from the animal experiments suggest that an abundant quantity of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> — or one of them — is of value for the utilization of the total diet as well as of the nitrogen, calcium and magnesium contained in it. The roasted products resulting from heating the bran (and bread) to a high temperature reduce the nitrogenous digestibility of the bran and increase the faecal output of nitrogen, calcium and magnesium through increased excretion of digestive juices. The nitrogenous substances, after heat treatment at 170°, also appear, according to the experiments on human subjects, to become less serviceable as building stones for the body.



## Angeführte Literatur.

- ABELIN, I.: *Biochem. Ztschr.* 1929. 215. 162.  
— *Ztschr. f. Kinderheilkunde* 1930. 50. 465.  
— *Biochem. Ztschr.* 1931. 232. 278.
- ABRAMSON, E.: *Svensk tandläkartidskr.* 1936. 29. 87.  
— *Sveriges off. statistik. Socialstatistik. Levnadsvillkor och hushållsvanor i städer och industriorter omkring år 1933.* Sthlm 1938. 286.
- ADOLPH, W. H., WANG, C. H. and SMITH, A. H.: *J. nutrition* 1938. 16. 291.
- ALBERS, H.: *Handbuch der Enzymologie I.* 408. Leipzig 1940.
- ANDERSEN, A. C. og NORMAN JENSEN, B.: 113. *Beretning fra Statens Forsøgslaboratorium, Kobenhavn* 1923.
- ARON, H. und GRALKA, B.: *Tabulae biologicae III.* 362. Berlin 1926.
- ASCHAM, L.: *J. nutrition* 1930—31. 3. 411.
- BERCZELLER, L. und WASTL, H.: *Biochem. Ztschr.* 1926. 177. 168.
- BERG, R.: *Skand. Arch. f. Physiol.* 1926. 47. 281.
- BICKEL, A.: *Arch. f. Kinderheilkunde* 1935. 107. 1.  
— *Die Brotnahrung des deutschen Volkes und seines Heeres in der Wirkung ihrer Eiweisse auf die Energetik des Zwischenstoffwechsels.* Leipzig 1937.
- BICKEL, A. und VAN EWEYK, C.: *Sitzb. Preuss. Akad. d. Wiss. zu Berlin* 1921:1. 325.  
— *Ztschr. f. d. ges. exp. Med.* 1927. 54. 75.
- BICKEL, A. und KORCHOW, A.: *Biochem. Ztschr.* 1928. 199. 434.
- BICKEL, A., SANDER, R. und SCHILLING, J.: *Münch. med. Wschr.* 1935: II. 1482.
- BIEDERMANN, W.: *Pflügers Arch. f. Physiol.* 1919. 174. 358.
- BLOOM, M. A.: *J. biol. chem.* 1930. 89. 221.
- BOAS-FIXSEN, M. A.: *Nutrition abstr. and reviews* 1934—35. 4. 447.
- BOAS-FIXSEN, M. A., HUTCHINSON, J. C. D. and JACKSON, H. M.: *Biochem. J.* 1934. 28. 592.
- BOAS-FIXSEN, M. A. and JACKSON, H. M.: *Biochem. J.* 1932. 26. 1923.
- BORGSTRÖM, S.: *Skand. Arch. f. Physiol.* 1938. 78. 65.
- BROWNING, E.: *The Vitamins.* London 1931.
- BRULL, L.: *Bull. Acad. Méd. Belg.* 1936. 1. 444.
- BURKARDT, A.: *Fortsehr. d. Medizin.* 1934. 52. 1151.
- CHICK, H.: *Lancet* 1940:1. 511.
- CHICK, H., BOAS-FIXSEN, M. A., HUTCHINSON, J. C. D. and JACKSON, H. M.: *Biochem. J.* 1935. 29. 1712.

- CHICK, H. and ROSCOE, M. H.: *Biochem. J.* 1930. 24. 105.
- COWGILL, G. R. and ANDERSON, W. E.: *J. Amer. med. assoc.* 1932. 98. 1866.
- CRAMER, W. and MOTTRAM, J. C.: *Lancet* 1927:2. 1090.
- DONALDSON, H. H.: *The rat.* 2. ed. Philadelphia 1924.
- VAN EWYK, C. und TENNENBAUM, M.: *Biochem. Ztschr.* 1921. 125. 238.
- FARNSTEINER, K.: *Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussmittel.* 1904. 7. 105.
- FRIDERICIA, L. S. og SCHOUSBOE, M.: *Nord. med. tidskr.* 1937. 14. 2054.
- FRIEDBERGER, E. und SEIDENBERG, S.: *Münch. med. Wschr.* 1927. 74. 1573.
- FRUMIN, Z. D.: *Vopr. Pitanija* 1938. 7. 3. (Zit. von *Ztschr. f. Unters. Lebensmittel* 1940. 80. 174.)
- GERICKE, W. F.: *Science* 1930. 71. 73.
- GREAVES, E. O. and MORGAN, A. F.: *Cereal chem.* 1934. 11. 228.  
— *Proc. Soc. exp. biol. and med.* 1933—34. 31. 506.
- GREENBERG, D. M., LUCIA, S. P., MACKAY, M. A. and TUFTS, E. V.: *J. biol. chem.* 1933. 100. 139.
- HAMMARSTEN, G.: *Skand. Arch. f. Physiol.* 1936. 75. 189.  
— *Lunds univ. årsskrift. N. F. Avd. 2.* 32. Nr 12. Lund 1937.
- HARDING, E. P. und DYSTERHEFT, G.: *Cereal chem.* 1927. 4. 47.
- HARRIS, L. J.: *Biochem. J.* 1937. 31. 799.  
— *Comptes-rendus du 5ème congrès internat. technique et chimique des industries agricoles* 1937. 1. 100. (Zit. von Fridericia og Schousboe, *Nord. med. tidskr.* 1937, 14. 2054.)
- HEUPKE, W.: *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1927. 41. 193.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1927. 41. 214.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1928. 44. 169.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1931. 49. 263.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1931. 49. 272.  
— *Ztschr. f. d. ges. exp. Med.* 1931. 75. 83.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1932. 51. 2.  
— *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1932. 51. 14.  
— *Arch. f. Hygiene* 1932. 108. 341.  
— *Verhandl. d. deutschen Ges. f. inn. Med.* 1933. 45. 420.  
— *Arch. f. Hygiene* 1934. 111. 188.  
— *Deutsch. med. Wschr.* 1934. 60. 1823.  
— *Die Umschau* 1937. 41. 751.  
— *Med. Praxis.* 28. Dresden und Leipzig 1939.
- HEUPKE, W. und MARX, A. V.: *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1928. 44. 23.
- HEUPKE, W. und THILL, O.: *Arch. f. Verdauungskrrh.* 1932. 52. 1.
- HINDHEDE, M.: *Skand. Arch. f. Physiol.* 1916. 33. 59.  
— *Skand. Arch. f. Physiol.* 1916. 33. 263.  
— *Biochem. J.* 1926. 20. 330.  
— *Skand. Arch. f. Physiol.* 1926. 47. 102  
— *Med. Welt* 1928. 2: 1341.  
— *Med. Welt* 1929. 3. 158 u. 192.

- JÄNSCH, H.: Arch. f. Verdauungskrrkh. 1937. 61. 278.
- JOHANSSON, J. E.: Sv. läkarsällskapets förh. 1917. 302.
- JOHANSSON, J. E., LANDERGREN, E., SONDÉN, K. och TIGERSTEDT, R.: Skand. Arch. f. Physiol. 1896. 7. 29
- JONES, D. B. and GERSDORFF, C. E. F.: J. biol. chem. 1925. 64. 241.
- JORDAN, H.: Ztschr. f. Unters. Lebensmittel. 1936. 72. 457.
- JØRGENSEN, H.: Biochem. Ztschr. 1935. 283. 134.
- KAPING, F. W.: Ztschr. f. Unters. Lebensmittel 1936. 72. 453.
- KESTNER, O.: Münch. med. Wschr. 1922. 69. 1429.
- KESTNER, O. und KNIPPING, H. W.: Die Ernährung des Menschen. Berlin 1926.
- KLEIN, A., HARROW, B., PINE, L. and FUNK, C.: Amer. J. of physiol. 1926. 76. 237.
- KOLLATH, W.: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. 1933. 170. 285.
- KON, S. K. and MARKUZE, Z.: Biochem. J. 1931. 25. 1476.
- KRAMER, B. and TISDAL, FR. F.: J. biol. chem. 1921. 47. 475.
- KROGH, M. and LINDBERG, A.-L.: Acta med. scand. 1938. Suppl. 90. 134.
- KUHL, H.: Das Mühlenlaboratorium 1938. 8. 142.
- LAWRYNOWICZ, A.: C. r. soc. biol. 1936. 122. 839.
- LANKE, L.: Tidskr. f. hemmet. 1927.
- LASSEN, H. KRIEGER: Undersøgelser over B-vitaminmaalinge — specielt i gær — ved hjælp af rottevekstmotoden. København 1935.
- LEHMANN, C., MUELLER, F., MUNK, I., SENATOR, H. und ZUNTZ, W.: Arch. f. path. Anat. u. Physiol. 1893. 131. Suppl.
- LEHNARTZ, E.: Chemische Physiologie. 4. Aufl. Berlin 1940.
- LEITCH, I.: Nutrition abstr. and reviews 1937. 6. 553.
- LIEBIG, J. v.: Die Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie. 8. Aufl. Braunschweig 1865.
- LUNDE, G., KRINGSTAD, H. og OLSEN, A.: Nord. medicin 1939. 3. 2533.
- MALOT, C.: Chem. Centr. 1887. 18. 873.
- MANGOLD, E.: Die Naturwissenschaften 1928, 16. 65.  
— Klin. Wschr. 1935. 14. 764.
- MANGOLD, E. und JÄNSCH, H.: Sitzb. Ges. naturforsch. Freunde Berlin. 1935. 40.
- MARX, A. V.: Arch. f. Verdauungskrrkh. 1927. 41. 180.
- MAURIZIO, A.: Die Nahrungsmittel aus Getreide. Bd 1. 2. Aufl. Berlin 1924.
- MITCHELL, H. H.: J. biol. chem. 1923—24. 58. 873.  
— J. biol. chem. 1923—24. 58. 905.
- MOELLER, J. Ztschr. f. Biologie 1897. 35. 291.
- MOHS, K.: Ztschr. f. Getreide- u. Mühlenwesen 1937. 24. 24.
- MORGAN, A. F.: J. biol. chem. 1931. 90. 771.
- MORGAN, A. F. and FREDERICK, H.: Cereal. chem. 1935. 12. 390.
- MORGAN, A. F. and KING, F. B.: Proc. Soc. exp. biol. and med. 1926. 33. 353.
- MURLIN, J. R. and MATTILL, H. A.: J. nutrition 1938. 16. 15.
- MURPHY, J. C. and JONES, D. B.: J. biol. chem. 1926. 69. 85.

- NEUMANN, M. P.: Brotgetreide und Brot. 2. Aufl. Berlin 1923.
- NEUMANN, R. O.: Vierteljahrsschrift f. gerichtliche Medizin und öffentliches Sanitätswesen 1917. 53. 91.
- NICOLAYSEN, R.: Skand. Arch. f. Physiol. 1934. 69. Suppl.  
— Skand. Arch. f. Physiol. 1936. 73. 75.
- NOORDEN, C. v.: und SALOMON, H.: Handbuch der Ernährungslehre. 1. 384. Berlin 1920.
- ODIN, M.: En socialhygienisk undersökning i Västerbottens och Norrbottens län (under åren 1929—31). Del 2. Lund 1934.
- PEARSON, P. B., HART, E. B. and BOHSTEDT, G.: J. nutrition 1937. 14. 329.
- PINCUS: Arch. f. path. Anat. u. Physiol. 1859. 16. 137.
- PLAGGE und LEBBIN: Veröffentlicht. aus dem Gebiete des Militär-Sanitätswesens 1897. 12. 1.
- POGGIALE, M.: C. r. des séances de l'acad. des sciences, Paris. 1853. 37. 171.
- REMY, E. und SCHREIBER, W.: Arch. f. Hygiene 1933. 110. 164.
- RIEDER, H.: Ztschr. f. Biol. 1884. 20. 378.
- ROSE, M. S. and VAHLTEICH, E. M.: J. biol. chem. 1932. 96. 593.
- ROSE, M. S., VAHLTEICH, E. M., TUNELL, E. H. and MACLEOD, G.: J. Amer. dietetic. assoc. 1932. 7. 369.
- RUBNER, M.: Ztschr. f. Biol. 1879. 15. 115.  
— Ztschr. f. Biol. 1883. 19. 45.  
— Arch. f. Hygiene. 1908. 66. 1.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1915. 120.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1915. 135.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1916. 61.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1917. 245.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1918. 53.  
— Arch. f. Anat. u. Physiol. 1918. 135.  
— Sitzb. d. preuss. Akad. d. Wiss. Berlin 1925. 127.
- SCHAEUNERT, A. und SCHIEBLICH, M.: Biochem. Ztschr. 1928. 202. 380.  
— Biochem. Ztschr. 1937. 290. 398.
- SHERMAN, H. C.: J. biol. chem. 1920. 44. 21.
- SHERMAN, H. C. and BURTON, G. W.: J. biol. chem. 1926. 70. 638.
- SHERMAN, H. C., ROUSE, M. E., ALLEN, B. and WOODS, E.: J. biol. chem. 1921. 46. 503.
- Statistik, Sveriges off., Jordbruk med binäringar. Av Statistiska centralbyrån. Årsväxten år 1940. Sthlm 1941.
- STEENBOCK, H. and COWARD, K. H.: J. biol. chem. 1927. 72. 765.
- STOLBA, F.: Sitzb. d. böhm. Ges. d. Wiss. Prag 1876. 210.
- STRASBURGER, J.: Arch. f. Verdauungskrrh. 1927. 41. 1.  
— Handb. norm. u. path. Physiol. 1929. 4. 681.
- STRAUSS, L.: Arch. f. Verdauungskrrh. 1927. 41. 11.
- TÄUFEL, K.: Handbuch der Lebensmittelchemie. V. 210. Berlin 1938.
- TELLER, G. L. and TELLER, W. K.: Cereal. chem. 1932. 9. 560.
- THOMAS, K.: Arch. f. Anat. und Physiol. 1909. 219.
- WERNER, K. H.: Ztschr. exper. Med. 1937. 100. 217.

- WESTERLUND, A.: Ann. Agricult. college Sweden 1938. 5. 417.
- WICKE, H.: Arch. f. Hygiene 1890. 11. 335.
- WIDMARK, E. M. P.: Bröd av sammalet eller finsiktat mjöl från folkhygienisk synpunkt. Foredrag holdt ved Nordisk Cerealkjemikerforenings kongress i Oslo 1937.
- WILLIAMS, R. R.: Cereal chem. 1939. 16. 301.
- WILLMOTT, S. G. and WOKES, F.: Lancet 1928:2. 668.
- ZIEGELMAYER, W.: Unsere Lebensmittel und ihre Veränderungen. Dresden und Leipzig 1933.
- ÅGREN, G. and LAGERLÖF, H.: Acta med. scand. 1936. 90. 1.
- Årsbok, Statistisk, för Sverige 1940, utg. av Statistiska centralbyrån. Sthlm 1940.
-

ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. II. SUPPLEMENTUM VIII.

\*

# VERDOPEROXIDASE

*A ferment isolated from*

*leucocytes*

*by*

*KJELL AGNER*

*(From the Biochemical Institution of the  
Medical Nobel Institute, Stockholm)*

STOCKHOLM 1941



## CONTENTS.

	Page
<i>Review of the Literature</i> . . . . .	5
Introduction . . . . .	5
Earlier Investigations on Indophenol Oxidase . . . . .	8
Morphological Investigations . . . . .	12
Investigations on Iron-Containing Oxidation Ferments . . .	13
The Structure of the Hemins in Certain Oxidation Ferments	18
Oxidation Ferments in White Blood Corpuscles . . . . .	19
<i>Experimental Investigations</i> . . . . .	23
Introduction . . . . .	23
Description of Material for the Preparation of Verdoperoxidase	24
Method for the Determination of the Ferment Content . .	25
Preparation of Pure Verdoperoxidase . . . . .	26
Further Treatment of the Red Fractions . . . . .	29
Recapitulation of the Procedure . . . . .	29
Analysis of Verdoperoxidase . . . . .	30
Nitrogen Analyses . . . . .	30
Iron Analyses . . . . .	30
Copper Analyses . . . . .	31
Measurement of Light Absorption . . . . .	33
Determination of the Reduction Equivalent . . . . .	35
Spectroscopic Investigations . . . . .	39
Survey of the Spectroscopic Results . . . . .	41
Activity Determinations . . . . .	42
The Preparation of Verdoperoxidase from White Blood Cells	
from a Patient with Myeloid Leukemia . . . . .	48
Demonstration of Verdoperoxidase in Chloroleukemic Infiltrates	50
Investigations on the Nadi-Reagent . . . . .	50
<i>Discussion</i> . . . . .	52
<i>Summary</i> . . . . .	58
<i>References</i> . . . . .	60







## Review of the Literature.

### Introduction.

In 1885 PAUL EHRLICH, in his work "Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus", communicated his observations on animals in which, 20—30 minutes before death, he had subcutaneously injected certain pigments which in the oxidized state were coloured and in the reduced state colourless. He showed that the pigments were deposited in the cells, and that the tissues appeared in different colours according as the substances in them were found in oxidized or reduced form. Alizarin blue, which in vitro is only to be reduced by strong reducing agents, was found, for example, in the liver, the lungs and the adipose tissue in the reduced form, while in other organs such as the heart, the grey matter of the brain and the diaphragm, as well as in the sub-maxillary and mammary glands, the pigment was found in the oxidized state. In experiments with indophenol blue, which is much more easily reduced than the previously mentioned pigment, the same result as with alizarin blue was obtained in most of the organs. Certain differences were, however, observed. The indophenol blue was found in the reduced form also in the sub-maxillary and mammary glands. EHRLICH considered that the results of these experiments justified him in drawing certain conclusions concerning what one might call the "oxygen-need" of different organs, and what he himself designated as "der Sauerstoff-ungesättigte Zustand des Protoplasmas". The liver, lungs and adipose tissue, according to him, had such a great "oxygen-need" that even a pigment like alizarin blue was reduced; the sub-maxillary and mammary glands, on the other hand, had not so great an oxygen-need, so that indophenol blue, but not alizarin, was reduced; while finally, the cardiac musculature and the grey matter of the brain were saturated in respect of oxygen.

EHRlich's interpretation of the experiment is a typical illustration of the current notions of his time. The cell as a whole was considered to be responsible for the reactions that took place. Not until later, with the further development of biochemistry, did the view emerge according to which the cell can be regarded as an organism in little, consisting of parts that are connected in a characteristic way. These have each their own specific functions, and all the parts together form a unit for the performing of all the reactions that characterize the life of the cell. That the occurrence of substances in oxidized or reduced form in the cells should constitute a criterion of "the oxygen-need of the *protoplasm*" can therefore not quite be brought into line with our present view.

At the time when EHRlich's experiments were carried out attempts had already been made to arrive at an understanding of the oxidative metabolism in the organism. One can follow the development in the literature from the idea that oxygen is activated, to the theory of activators and the first proofs of their existence in biological substances, right up to our present view of the problem, according to which the oxido-reduction processes are regulated by "enzymes" or "ferments".

As early as 1855, SCHÖNBEIN, in studies of ozone and hydrogen peroxide, had found that plant and animal tissues were able, in common with ferrous salts, to activate hydrogen peroxide and other peroxides, and by oxidation to colour guaiac tincture blue. In his opinion, by the mediation of certain substances in the blood, oxygen underwent a "polarisation" and became ozone, and this, together with water, formed hydrogen peroxide. SCHÖNBEIN interpreted the ability to split peroxides as a property inherent in the tissue as such, and not until long afterwards did RAUDNITZ (1899; 1901) and LOEW (1901) make it clear that the activation was due to special ferments, catalases and peroxidases, of which the former liberate oxygen from hydrogen peroxide, and the latter transfer oxygen from hydrogen peroxide to certain substrates.

On the basis of certain experiments, HOPPE-SEYLER (1883) advanced the hypothesis that the oxidation in vitro was to be explained by the arising of "active" oxygen, oxygen in the atomic state. The oxidation in the cells, he assumed, was performed in an analogous way. The active oxygen was supposed to be formed by a splitting of the oxygen molecules by active hydro-

gen arising in reduction processes, the splitting being accompanied by the formation of water and "free oxygen".

The importance of catalysts in oxidation was demonstrated by TRAUBE (1882), also in connection with experiments in vitro. By means of certain difficultly oxidizable metals in a finely divided state, the oxygen atoms in the oxygen molecule and in certain oxygen-rich compounds such as hydrogen peroxide are "activated" and should then be able at ordinary temperature to oxidize not easily oxidizable substances. According to TRAUBE, a similar activation of oxygen took place in the metabolism in the organism, in which connection the tissue as such served as catalyst. This hypothesis came to be, however, of only theoretical interest for his time, as he could not bring forward any experimental proof of its correctness.

The catalyzing effect of the tissues in oxidative reactions was first demonstrated by GAD and WURSTER (1887) who observed a rapid blue colouring of tetramethylparaphenyldiamine in the presence of, amongst other things, muscle preparations.

RÖHMANN and SPITZER (1895), however, published the work that proved of the greatest importance for the further development of the experimental investigations in this field. These authors found that indophenol blue, one of the pigments that EHRLICH had employed ten years previously in the investigations that led to the assumption of "der ungesättigte Zustand des Protoplasmas", was rapidly oxidized in the presence of tissues. This function of the tissues was considered to be due to the fact that they contained certain oxygen activators, or oxidation ferments.

At about the same time that RÖHMANN and SPITZER's investigations were carried out, the literature was enriched with articles on researches on substances with similar oxidation-promoting properties. An enzyme that oxidizes monophenols, "monophenolase" or "tyrosinase" was described by BOURQUELOT and BERTRAND (1895). As early as 1883, YOSHIDA had demonstrated the occurrence of "polyphenol oxidase" in the Japanese lacquer-tree. As has previously been mentioned, LOEW, also at the turn of the century, showed that the hydrogen peroxide-splitting capacity of the tissues was due to two different ferments, catalase and peroxidase.

## Earlier Investigations on Indophenol Oxidase.

Reference has already been made to RÖHMANN and SPITZER's demonstration of the capacity of various tissues to activate the formation of indophenol blue from  $\alpha$ -naphthol and dimethylparaphenylendiamine. The activating substance could be extracted from the organ, and it retained its activity even after alcohol and acetone precipitations. This reaction, which has been very largely employed in later investigations, is generally referred to as the Nadi-reaction (the designation has arisen from the use of the two first letters in the two reagents), and it has been considered to be due to the occurrence in the cells of a special ferment, indophenol oxidase.

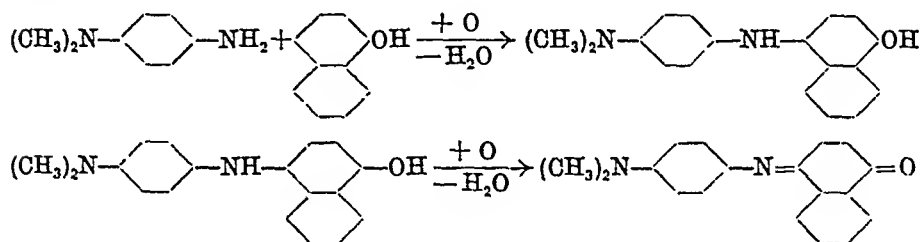
SPITZER (1897) continued the investigations alone, and came to the conclusion that the oxygen activator that could be extracted from the cells was to be looked upon as a nucleo-proteid. He also found that iron was present in the activator, being bound in such a way that it could not be split off by the action of hydrochloric acid or alkali.

In a great many investigations this Nadi-reaction was employed for the qualitative demonstration of oxidases in both the plant and the animal kingdoms, and one can scarcely find any tissue that has not been investigated. With the help of this reaction it has been ascertained that the catalyzing substance is very widely distributed, as all aerobically living cells seem to contain it.

In the works that were published during the decade immediately following the turn of the century, oxidase and peroxidase reactions were not always distinguished with sufficient strictness. It was chiefly in a series of works by CHODAT and BACH that their different functions were made clear by investigations of plant material. In 1903, moreover, these authors were able to advance definite proof of the existence of ferments with such specific functions, as they were able to isolate oxidases and peroxidases from each other by fractional alcohol precipitations.

By *oxidase reaction* is meant a reaction where the oxidation of the substrate takes place on the basis of an "activation" of *molecular oxygen*. This activation implies that the oxygen is converted to such a form that it has a tendency to enter into reactions. A reaction is referred to as a *peroxidase reaction* if oxygen is transferred by the mediation of a ferment from a *per-*

oxide to a substrate. For the demonstration of oxidases in animal tissues the above-mentioned Nadi-reagent has generally been employed. By the consumption of oxygen the substances in the reagent are oxidized and form a blue compound. The reaction may take place by autoxidation of the reagent itself, though in this case the velocity of the reaction is low. It can, however, be increased under the influence of catalysts in tissues, which has been considered to be a function of the oxidase content. According to RÖHMANN and SPITZER, the Nadi-reaction takes place in two phases:



Guaiac tincture and benzidine, which give a blue colour in the presence of hydrogen peroxide and an activator, are generally employed for the demonstration of peroxidases.

It has not previously been observed that upon the autoxidation of the Nadi-reagent hydrogen peroxide is formed. This observation of the author will be further discussed in the experimental part of the present work, but attention may be drawn to the fact already here, for it must be taken into consideration in the estimation of the results where the reaction has been explained as being due only to the presence of an oxidase.

v. CZYLARZ and v. FÜRTH (1907) showed that also in organs of animal origin it was necessary to distinguish between oxidase and peroxidase reactions. They showed that several positive reactions that had been observed on addition of only guaiac tincture to a tissue, and that had been interpreted as being due to oxidases were actually caused by peroxidases. The reason why reactions without the addition of hydrogen peroxide had been obtained was that the reagent in question, guaiac resin, had formed peroxides in the presence of oxygen. LIROSSIER (1898) had already drawn attention to this formation of peroxides.

In a number of very well-known works, VERNON, and BATTELLI and STERN have given accounts of investigations on the

occurrence and activity of indophenol oxidase. By working out a quantitative determination method, VERNON (1911) was able to give the content in the different organs of the activator in question, and then to correlate this with the previously known functions of the different organs.

The determinations of the activity were carried out under such conditions that the formation of hydrogen peroxide by autoxidation must have been greatly favoured. VERNON used up to 1 gr. of ground tissue, and allowed this to act upon 5 ml. of Nadi-reagent in a PETRI-dish with a diameter of 8.8 cm. for 1—5 hours. From these data we see that the contact surface between air and fluid was considerable, being 60 cm.<sup>2</sup>, and that the layer of fluid was not more than about 0.1 cm. The coloured substance that was obtained was dissolved in alcohol and determined colorimetrically.

The catalyzing effect of different organs was compared by VERNON, who found it to be greatest for cardiac musculature. The effect for skeletal musculature, kidneys and brain was only about half as great, and even considerably less for the parenchyma of the liver and the lungs. The results obtained were compared with EHRlich's observations, the comparison showing that the oxidase content was on the whole inversely proportional to the "reducing capacity" of the organ. VERNON suggested that the oxygen-activating substance in the cell formed peroxides, which could be used for the oxidation of suitable substrates through the mediation of a peroxidase. In those tissues which contained only small amounts of oxidase the peroxide formation should thus be slight. In such tissues there would therefore tend to accumulate an excess of reducing substances. VERNON considered that he had some support for his assumption of the presence of two different activators in the circumstance that on being warmed up to 60° C. the tissues lost their capacity to form indophenol blue aerobically, while the peroxidase activity remained intact. The substance that activated the molecular oxygen, the oxidase, that he called "oxygenase", was in his opinion thermostable, while the peroxidase, as being thermostable, was not considered as a ferment in the strict sense. At that time a difference was made between "oxidases", which could be extracted, and "oxygenases" (BACH and CHODAT, VERNON) or "oxidones" (BATTELLI and STERN), which could not be extracted from the cell structure.

The method used by VERNON in the determination of the oxidase effect by measuring the amount of coloured substance formed was shown by BATTELLI and STERN (1912) to suffer from certain defects. So, for example,  $\alpha$ -naphthol had an inhibiting effect on the oxidation, and already-formed indophenol blue was easily decolorized by reduction under the influence of reducing substances in the tissues. They therefore worked out a new method, using as a criterion of the oxidase effect the consumption of oxygen gas. They found their results to agree, on the whole, with VERNON's. Thus, the oxidase effect was, in relation to other organs, considerable in e. g. the heart and musculature. They found, however, an interesting exception. VERNON had shown that the indophenol formation with liver tissue as activator was slight. BATTELLI and STERN found the oxygen consumption, in experiments on the liver, to be equal to that which one finds, for example, in muscles and kidneys. Certain observations made by VERNON and interpreted by him as being due to the occurrence of two catalysts, an oxidase and a peroxidase, were followed up by BATTELLI and STERN. Basing their statements on the results from their experiments, they asserted that the formation of indophenol blue is due to only one thermostable oxidase, and that the thermostable factor giving the impression of a peroxidase was to be explained as an unspecific peroxidase activity of the hemoglobin.

In a third communication BATTELLI and STERN (1914) gave an account of further investigations on the oxygen activator in the tissues. The substance that was considered to be responsible for the oxidation of paraphenyldiamine had not previously been obtainable free from cell structures. By means of a powerful mechanical grinding process in a mill designed by BORREL, however, the cells were disintegrated. The substance did not lose its activity in this process, and was dissolved, on extraction, with faintly alkaline solutions. It was influenced in its activity by the same factors as when it was bound to the cell structures. The substance was precipitated in faintly acid solution and again dissolved, after centrifugation, in faintly alkaline solution. The result thus showed that as long as the cells retained their structure, the oxidase was not extractable and only when the tissue was destroyed, was it possible to dissolve the ferment. The authors believed that on account of these properties the oxidase was closely akin to the nucleoproteids.



### Morphological Investigations.

The observations made by RÖHMANN and SPITZER, that tissues are able to catalyze the formation of indophenol blue by oxidation, have given rise not only to the investigations already mentioned, in which attempts have been made to arrive at a clear idea of the mechanism of this effect, but they have also inspired attempts to localize the occurrence of these activators in the cells.

WINKLER (1907) demonstrated that leucocytes of different origin, fixed in alcohol-formalin and stained with Nadi-reagent, showed small blue grains in the cytoplasm. The reaction was characteristic for leucocytes and leucocyte-containing tissues; other tissues and cells gave negative result.

A number of investigators, especially SCHULTZE (1909), v. GIERKE (1909) and GRÄFF (1912; 1922), showed, however, that the reaction could be applied also with other cells, if it was performed in a modified way. According to GRÄFF (1922) the reaction was divided into two groups, the "myelo-Nadi-reaction" and the "tissue-Nadi-reaction" ("Gewebs-Nadi-reaction").

GRÄFF spoke of a "myelo-Nadi-reaction" when the staining was carried out in alkaline solution with formalin-alcohol fixed preparations, and of a "tissue-Nadi-reaction" when the reaction was performed on tissues that had not previously been fixed, and when the staining was carried out in a buffer solution at pH 8.0—9.0.

It is apparent that the methods for demonstrating the oxidation catalyst are in the two cases very different. Despite this difference in the procedure, however, GRÄFF did not consider them to be different in principle or conditioned by differences in the ferments that produced the reaction. He regarded it as probable that the morphological structure of the cell was decisive for the result of the reaction. In the former case protective substances would prevent an inactivation of the ferment, while the activator in the latter case would more easily be influenced by injurious substances. This explanation of the differences of the reaction has never been completely accepted, and several other possibilities have been suggested — e. g. that the myeloid elements contain catalysts which are not to be regarded as ferments.

The activator that causes the tissue-Nadi-reaction is probably one of the most commonly occurring in Nature. It is clear from all the investigations that have been made that all aerobically living cells give a positive reaction.

GRÄFF (1922) showed that the indophenol formation was inhibited by hydrogen cyanide in very small concentrations (m/10,000). The general distribution and the cyanic inhibition of the indophenol oxidase were factors that led him to suggest that this ferment might be identical with the iron catalysts in the cells described by WARBURG (1914; 1921).

### Investigations on Iron-Containing Oxidation Ferments.

Since the middle of the 1920's, the current view of the oxidation processes in the cells has undergone a great change through the discovery and isolation of a number of substances having the capacity to bring about oxidative reactions.

Earlier, it had been warmly discussed as to how far an activation of oxygen by iron-containing substances was the necessary condition for the oxidation in the tissues, as WARBURG thought, or whether, as WIELAND conceived the matter, the oxidation was to be regarded as a dehydrogenation. These two views were obviously conflicting and apparently mutually exclusive. v. SZENT-GYÖRGYI (1924) showed that there were strong reasons in favour of both opinions, and that they could be suitably combined, pointing out that the oxygen activated by iron compounds would react with active hydrogen formed during dehydrogenation.

WARBURG et al., who had earlier demonstrated the importance of iron as a catalyst in the activation of oxygen, showed in a later work (1928) that in certain cells there was a substance that regulated the aerobic oxygen uptake. Since carbon monoxide had an inhibiting effect which was more or less counteracted by irradiation with light of different wave-lengths, the absorption spectrum of the substance ("das eisenhaltige Atmungsferment") could be determined photo-chemically. The absorption-bands found in this connection corresponded to those that had been found for iron-porphyrin compounds bound to proteins. The light-absorption for the carbon monoxide compound of the ferment had four maxima in the visible part of the spectrum, at 593, 540, (520) and 433  $m\mu$  (KUBOWITZ and HAAS, 1932). The

strongest bands, at 593 and 433  $m\mu$ , are displaced towards the long-wave direction by about 20  $m\mu$  as compared with the carbon monoxide compounds of protoheme-protein compounds such as CO-hemoglobin and CO-myoglobin.

It had long been known that in all cells where oxygen was consumed there were spectroscopically observable compounds, which MAC MUNN (1886; 1887; 1889) referred to as histohematin or myohematin, and which KEILIN (1925) later called cytochromes. These substances are reversibly oxido-reducible, and one can observe in the spectroscope characteristic absorption-bands for the oxidized and for the reduced forms respectively. They do not react with carbon monoxide or hydrogen cyanide. Nevertheless, their aerobic oxidation in the cells is inhibited by HCN and CO. WARBURG et al. considered this to be due to the fact that for the oxidation of the cytochromes an autoxidizable compound was required, that was inhibited by both carbon monoxide and hydrogen cyanide ("das Atmungsferment").

In 1929 KEILIN published a work in which he gave experimental proof that the previously mentioned indophenol oxidase in yeast and in cardiac musculature was the same substance as that which oxidized certain reduced cytochromes. Indophenol oxidase, cytochrome oxidase and WARBURG's oxygen-transmitting enzyme of respiration were thus to be regarded as one and the same ferment.

In a later work, KEILIN and HARTREE (1938) showed that the oxidase in cardiac musculature does not directly oxidize p-phenyldiamine, but that this oxidation takes place through the mediation of cytochromes. The mechanism was thus as follows: the cytochrome oxidase oxidizes cytochrome and this in its turn the substrate. A ferment, indophenol oxidase, did not exist as such, but consisted of a system comprising cytochrome and cytochrome oxidase.

In a preliminary report, ALTSCHUL, ABRAMS and HOGNESS (1939) communicated that they had isolated a soluble cytochrome oxidase from yeast. The complete analogies in the inhibitory relations (HCN, CO, catalase) between the soluble cytochrome oxidase and the peroxidases isolated from plant material by THEORELL and SWEDIN (1939; 1940) led THEORELL (1940) to express the thought that this oxidase might really have a peroxidase effect. ALTSCHUL, ABRAMS and HOGNESS (1940)

also showed in a later publication that the activator that they themselves had previously regarded as an oxidase was a peroxidase which as a specific substrate had reduced cytochrome. It was therefore called cytochrome peroxidase.

The cytochromes show 4 absorption-bands on spectroscopic examination after reduction. The three first, a, b, and c bands have proved to be  $\alpha$ -bands for three different cytochromes, while the fourth band is the  $\beta$ -band for the one, or possibly for two, of the cytochromes. The different components have been called: *cytochrome a*, ( $\alpha$ -band in the red wave-length region), *cytochrome b* ( $\alpha$ -band at 555—566  $m\mu$ ) and *cytochrome c*, ( $\alpha$ -band at 550  $m\mu$ ). The exact position for the bands varies somewhat in different objects, and according to these displacements one can classify the components in sub-divisions. The most unhomogeneous of the cytochromes is the a-group, with  $\alpha$ -bands situated between 585 and 645  $m\mu$ , and various substances that belong here have been classified as a,  $a_1$ ,  $a_2$  and  $a_3$ .

Cytochrome a and  $a_3$  probably contain the same hemin compound, as they have the same absorption-band at 605  $m\mu$ . According to a work by KEILIN and HARTREE (1938), the one (a) is not autoxidizable and reacts neither with carbon monoxide nor with hydrogen cyanide, while the other ( $a_3$ ) is autoxidizable and reacts with both carbon monoxide and hydrogen cyanide. The carbon monoxide compound that was formed by  $a_3$  showed an absorption-band at 593  $m\mu$ , or at the same wave-length as WARBURG et al. had determined photo-chemically for the corresponding band of the carbon monoxide compound of the oxygen-transmitting ferment. KEILIN and HARTREE therefore consider cytochrome  $a_3$  to be the same as the respiratory ferment. For certain reasons, however, it was thought not to be identical with cytochrome oxidase.

A direct spectroscopic investigation of a suspension of *Bact. pasteurianum* by WARBURG and NEGELEIN (1933) showed the presence in these organisms of a substance with characteristic bands, that were supposed by them to belong to a cell oxidase. In the absence of oxygen, besides the  $\alpha$ -band of the reduced b and c cytochromes, a diffuse absorption-band in yellow was observed, which was assumed to be the  $\alpha$ -band of the reduced oxidase. In carbon monoxide atmosphere a carbon monoxide-ferment compound was formed with absorption-band at 593  $m\mu$ , an absorption maximum that corresponded to that which had

been found for the oxygen-transmitting ferment. If the suspension was saturated with oxygen, this band disappeared, as did also the cytochrome bands. If, however, the suspension was saturated with oxygen in the presence of cyanide, the bands belonging to the reduced cytochromes remained, while a new band appeared at about  $640\text{ m}\mu$ . This band, according to WARBURG and NEGELEIN, was due to the formation of a cyanide compound with the ferment iron, and this blocking of the active group of the ferment would explain why the reduced cytochromes b and c were not oxidized.

KEILIN (1933; 1934) expressed the view that this substance was not to be regarded as an oxidase or an oxygen-transmitting enzyme, but that it was a derivative of the cytochromes, and probably of the cytochrome a. He showed that the absorption spectra for different cultures of *Bact. pasteurianum* varied with the strain of the organism, the culture medium and the age of the culture.

Spectroscopic investigations of other micro-organisms also showed a great variation in the absorption-bands of the cytochromes. In the majority of cases the spectrum that has been given as the usual one for reduced cytochromes was observed with  $\alpha$ -bands at  $603$ ,  $565$  and  $550\text{ m}\mu$ ; but in other cases the absorption-bands were quite different. In *Bact. proteus* and *B. coli*, for example, a band at  $560\text{ m}\mu$ , called  $b_1$ , took the place of the b and c bands, while two bands, one faint band at  $590\text{ m}\mu$  ( $a_1$ ) and a stronger one at  $628\text{ m}\mu$  ( $a_2$ ) took the place of the a band. On shaking with air, the band at  $628\text{ m}\mu$  was replaced by one at  $645\text{ m}\mu$ . These bands at  $628$  and  $645\text{ m}\mu$  are thus the  $\alpha$ -bands for the reduced and oxidized forms of a component of the  $a_2$  group.

On the addition of hydrosulphite to a suspension of baker's yeast, which had been carefully acidified with hydrochloric acid in the presence of oxygen, a compound was obtained that did not show the normal a band at  $603\text{ m}\mu$  but only a faint shadow in yellow. In the presence of carbon monoxide a sharper band at  $596\text{ m}\mu$  appeared.

These experiments showed that the cytochromes in different cells did not have a uniform structure, and KEILIN considered that the cytochromes, especially cytochrome a, were labile substances that were easily converted. The compound described by WARBURG and NEGELEIN was presumed to be such a conversion

product, and KEILIN therefore declared that it had no function as oxidase or oxygen-transmitting enzyme.

The active groups in peroxidase from horse-radish and yeast, as well as in catalase, have also been shown to be iron-porphyrin compounds.

In an earlier work by WILSTÄTTER and POLLINGER (1923) the activity of the horse-radish peroxidase was considered not to be due to iron compounds. On the contrary, KEILIN and MANN (1937) were of the opinion, that this peroxidase was a hemin-proteid similar to methemoglobin with absorption-bands in the visible part of the spectrum at 645, 583, 548 and 498  $m\mu$ . THEORELL (1941) showed that these bands, which had been considered to belong to *one* compound, were due to *two* peroxidases with different absorption-bands. Peroxidase I was a parahematin, which on reduction with hydrosulphite showed absorption-bands at 565 and 535  $m\mu$ ; and peroxidase II showed points in common with methemoglobin. Final proof of the occurrence of the hemin as a prosthetic group in peroxidases was also given by THEORELL. In acetone to which HCl had been added, peroxidase II was split into two components, a colourless protein component and a hemin component. Taken separately, these were inactive. If, however, protohemin was added to the protein component, a fully proportional reactivation of the ferment was obtained.

The peroxidase from plants, according to an earlier communication by SWEDIN and THEORELL (1939), also acted as dihydroxymaleic acid oxidase. This effect was explained as being due to an intermediary hydrogen peroxide formation occurring in the oxidation of the dihydroxymaleic acid. Both of the two peroxidases have this property. Here, then, is an illustration of the fact that a peroxidase may, under certain conditions, act as an "oxidase".

The cytochrome peroxidase isolated by ALTSCHUL, ABRAMS and HOGNESS (1940) had the specific effect that in the presence of hydrogen peroxide it oxidized cytochrome c, while other substrates such as pyrogallol were not oxidized. The preparation contained 0.30 % of hemin, and showed a spectrum that was typical for iron-porphyrin-protein compounds.

The disintegration of hydrogen peroxide was proportional to the hemin content of different catalase preparations, shown by ZEILE and HELLSTRÖM (1930); and STERN (1936) proved that the catalase hemin was protohemin. The catalase preparations

in purest form from horse and cow liver (AGNER, 1939, SUMNER and DOUNCE 1939) contain hemin-bound iron in a concentration of 0.09 and 0.05 % respectively

### The Structure of the Hemins in Certain Oxidation Ferments.

Absorption maxima for the carbon monoxide compound of the oxygen-transmitting ferment showed, in relation to those of the protohemin, a displacement of on the whole 20  $m\mu$ . In order to gain an insight into the structure of the hemin compound of the oxygen-transmitting ferment, WARBURG sought for other substances having absorption-bands agreeing with those of the respiratory ferment. He found such substances among the so-called mixed-coloured hemins. The porphyrins, from which these hemins derive, were obtained by reduction of chlorophyll and were called pheoporphyrins. From pheoporphyrin b he produced pheohemin b, coupled this to globin and thus obtained a compound whose carbon monoxide compound, compared with the oxygen-transmitting ferment, showed a displacement of the Soret-band by 2  $m\mu$  and of the  $\alpha$ -band by 8  $m\mu$  towards the red end of the spectrum. He came still closer, when he coupled spirographis hemin to globin. The deviations were then only 1 and 4  $m\mu$  respectively.

Of course, such a similarity in the position of the absorption-bands can only be considered to be a probable proof of similarity in the structure of the compounds. The spirographis hemin and the pheohemin both contain, besides the oxygen in the carboxyl groups, one oxygen atom per molecule. Spirographis hemin, for example, contains a formyl group instead of a vinyl group. In the same way, the hemin of the oxygen-transmitting ferment probably contains oxygen in some oxidized side-chain.

The cytochrome  $a_1$  group, which has absorption-bands at 586—590  $m\mu$ , are probably hemochromogens, containing hematin compounds with oxidized vinyl groups described by NEGELEIN (1933) and ROCHE and BÉNÉVENT (1936). The spirographis hemin, as also perhaps the hemins of the oxygen-transmitting ferment (according to KEILIN  $a_3$ ) and of other cytochromes, may therefore perhaps be conceived as formed from protohemin through oxidation of one or both vinyl groups.

According to LEMBERG et al. (1937; 1938; 1939) the bands

for a<sub>2</sub> were not to be considered as belonging to uniformly constructed compounds. The band at 628 m $\mu$  in *Bact. coli* derived from a bile-pigment. The hydrogen cyanide compound with an absorption-band at 639 m $\mu$ , which WARBURG et al. had observed in suspensions of *Bact. pasteurianum*, was considered to be an iron-oxyporphyrin compound, arising under non-physiological conditions.

That the structure of the porphyrin in a hemin-containing ferment determines the position of a ferment's absorption-bands, is also exemplified by cytochrome c (THEORELL and ÅKESSON 1941). The absorption-bands for the latter are in relation to the corresponding bands of the proto-hemin compounds displaced about 7 m $\mu$  towards the blue. This displacement is explained by the fact that the prosthetic group of the cytochrome has been formed from protohemin by the addition of sulphhydryl groups to the vinyl groups (THEORELL 1938; 1939; ZEILE and MEYER 1939).

### Oxidation Ferments in White Blood Corpuscles.

As early as 1868, KLEBS, and a few years later, in 1872, STRÜVE, showed that guaiac tincture, that SCHÖNBEIN had used in demonstrating activated oxygen, was stained blue by pus. A number of further investigations on this observation were carried out, and ACHALME (1899) supplemented these with the information that also the formation of indophenol blue from dimethyl-paraphenyldiamine and  $\alpha$ -naphthol was activated.

An attempt to characterize more precisely the substance that provoked these reactions was made by BRANDENBURG in 1900. He showed that besides pus, also leukemic blood was able to stain guaiac resin blue. Also bone-marrow, unlike other organs such as the thymus, spleen and lymph glands, showed a positive reaction. From his results he came to the conclusion that bone-marrow and the leucocytes deriving from it, unlike lymphocytes, lymph glands and other tissues, were provided with a substance that could be demonstrated by means of the above-mentioned reaction. He isolated the active substance and found, inter alia, that it contained iron and phosphorus so bound that they were not easily liberated from their compounds. Certain properties of the substance were considered by him to constitute support for the assumption that, as SPITZER had shown in 1897 for oxygen



activators isolated from other material, it consisted of nucleoproteids. He suggested that the activity did not belong to the isolated substance as such, but that it might be bound to a ferment, which, however, was not to be separated from the nucleoproteid.

These investigations were continued by MEYER (1903), who once again showed the difference between white blood corpuscles belonging to the myeloic and the lymphatic forms respectively. Blood from patients with myeloic leukemia showed a strong blue colouring in the guaiac reaction, while he did not find this in cases of lymphatic leucemia. That the substance that provoked this reaction was only a conversion product in the pus cells, or appeared in the leucocytes in such a disease as myeloic leucemia, was excluded by MEYER's demonstration of their occurrence in leucocytosis in a case of pneumonia. Like BRANDENBURG, MEYER also found that the substance that caused the reaction could be extracted from the cells. He also demonstrated its precipitability with alcohol and ammonium sulphate and its thermo-sensitivity. The preparations purified by alcohol and ammonium sulphate precipitation gave strong guaiac reaction but not a trace of biuret reaction, from which he drew the conclusion that the reaction should be activated by substances of a non-protein nature.

The works referred to above have shown that white blood corpuscles and substances isolated from these stain guaiac tincture blue. This function was believed to be due to an oxidase present in the cells. LIROSSIER, however, in 1898, had shown that such a colour reaction with guaiac resin or similar chromogens with pus as activating substance only takes place on addition of hydrogen peroxide, and that what had sometimes been called an oxidase reaction was actually a peroxidase reaction. Only a very small amount of hydrogen peroxide is necessary, and the peroxide that may be formed in the reagent in the presence of oxygen, even in a relatively short time, is quite sufficient to provoke the reaction.

The problem concerning the occurrence of peroxidase in the leucocytes was complicated by the fact that MOITESSIER (1904) had shown that hemoglobin and other hemin compounds were also able to catalyze peroxidase reactions. The question as to whether the reaction activated by the white blood corpuscles could be due to compounds deriving from the blood-pigment

was dealt with by v. CZYLARZ and v. FÜRTH (1907). A radical difference in the peroxidase function of the hemoglobin or hemin on the one hand and leucocytes on the other was demonstrated by a comparative study of the colour development, using hydrogen peroxide and leucomalachite green as substrate. The peroxidase from leucocytes showed at first a great activity, with strong development of colour, which gradually diminished and finally stopped altogether. The peroxidase effect of the hemin compounds, however, was proportional to the time. They considered that this difference in the peroxidase effect of the different preparations must be conditioned by a difference in the nature of the two substances, and that the leucocyte peroxidase was to be regarded as a specific ferment.

The oxygen-activating capacity of the leucocytes has since been further described in a number of works. The results communicated are, however, very varying, owing to differences in the carrying out of the experiments and to the fact that different reagents have been used. So, for example, MANCINI (1910) writes that leucocytes from horse-blood showed a very strong oxidase reaction with the Nadi-reagent, while no peroxidase reaction could be demonstrated. TSCHERNORUZKI (1911), on the other hand, found that leucocytes obtained by injecting sterilized aleuronate into the pleural cavity in dogs gave a strong peroxidase, but no oxidase effect with fresh guaiac tincture.

Although v. CZYLARZ and v. FÜRTH had shown very beautifully that leucocytes contain a peroxidase whose effect differs in a characteristic way from that which is provoked by hemoglobin or its derivatives, one nevertheless finds a number of authors in the literature expressing the opinion that the peroxidase effect of the blood is due solely to the unspecific activity of the oxy-hemoglobin. This view was disproved again by NIKOLAJEW (1928), who isolated leucocytes from horse-blood and found in an extract of these that there was no parallelism between the peroxidase effect and the intensity of colour of the extract. He therefore considered that the peroxidase activity could not, at all events, be explained solely through the occurrence of blood-pigments, but that there ought to be a specific ferment.

WINKLER (1907) had discovered, as previously stated, in his morphological studies that on staining of preparations with the Nadi-reagent small blue grains were deposited in the cytoplasm of the leucocytes. This observation was interpreted by

him as being due to the occurrence in the cells of a special activator, "oxidase". The reaction proved to be characteristic for leucocytes and leucocyte-containing tissues, such as bone-marrow, and also for the lachrymal and the salivary glands. Other tissues and cells gave negative results, and it should be pointed out as especially noteworthy that lymphocytes did not contain such oxidase.

Besides the micro-chemical works, in which the activating substance has been described as an oxidase, a large number of investigations have been carried out in which activators causing peroxidatic reactions have been demonstrated. So, for example, FISCHER (1910), using a benzidine reaction, found a thermolabile peroxidase in the cytoplasm of eosinophil and neutrophil leucocytes, while the lymphocytes and basophil cells did not give any such reaction. It has been discussed as to whether this activator for the peroxidase reaction is identical with that which caused the above-mentioned oxidase reaction, or whether there exist two different ferments. The discussion has not brought forth a decisive proof of either view.

An observation by WEISS (1891) showed that the white blood corpuscles are broken down under digestion with trypsin, though the eosinophil granules in the cells were in this connection very resistant. Using a similar procedure, PETRY (1908; 1912) isolated eosinophil granules from white blood corpuscles and from the cells in bone marrow. In two reports he gave an account of the results, and was able to characterize the substance obtained to a certain extent. It was difficultly soluble and resistant to trypsin and alkali, and stainable with acid pigments. It also contained iron.

The function of this substance was not, however, investigated by PETRY, and not until 1924 did NEUMANN show that the eosinophil granules had a very strong peroxidase effect. From leucocytes from horse-blood he prepared a greyish green substance which gave an intensive peroxidase reaction. On staining with eosin the preparation took on a pink colour, and microscopic examination showed grains with red-stained contours, the interior of the grains being stained yellow-red. In all probability the substance prepared by NEUMANN received its colour and its effect from the "verdoperoxidase", that will be described in the following.

## Experimental Investigations.

### Introduction.

The catalase preparations obtained in purest form from cow and horse liver (SUMNER and DOUNCE, 1939, AGNER, 1939), have been found to contain, besides protohemin (STERN, 1936), a green coloured substance, biliverdin (LEMBERG et al., 1939). It is as yet quite uncertain as whether the biliverdin has any significance in relation to the function of the catalase. This is, of course, possible; but on the other hand it is quite conceivable that the occurrence of the biliverdin in liver catalase is due to the presence of large amounts of bile pigment in the liver, and that the linkage of the biliverdin in the liver catalase molecule is to be regarded as a mere coincidence and a result of the particular milieu. It therefore seemed to be of interest to try whether catalase prepared from other material than liver would also contain such a pigment. For this reason a leucocyte-rich material was chosen for the experiment, namely, empyema. The isolation of catalase from this material proved, however, to be connected with considerable difficulty, partly on account of the low catalase activity of the material, and partly owing to the disappearance of this activity in the process of preparation. These experiments have thus not led to any result in the above-mentioned question.

The empyema proved, however, to contain certain other pigmented substances with characteristic absorption-bands, substances which it has also been possible to isolate from other leucocyte-rich material. As will be shown in the sequel, these substances derive from the leucocytes themselves, where they function as oxidation ferments.

These isolated, pigmented substances are three in number. The one that has been described in most detail in the present work has certain very pronounced characteristics.\* When oxi-

dized, it has a brownish green colour with absorption-bands, observable in the spectroscope, at 625 and 570  $m\mu$ . On reduction, the colour changes to clear green, and absorption-bands are observed at 637 and 475  $m\mu$ . Further, the substance reacts like a peroxidase. On account of its colour and its manner of action, and in order to distinguish this substance from other peroxidase substances prepared chiefly from horse-radish (THEORELL, 1941), and yeast (ALTSCHUL, ABRAMS and HOGNESS, 1940), I suggest that this ferment be called "verdoperoxidase", abbreviated, V.P.O.

Another substance, probably having the character of a ferment, that was observed and isolated, shows absorption-bands at 625 and 538  $m\mu$ , and in the reduced form a very sharp  $\alpha$ -band at 559 and a less sharply defined  $\beta$ -band at 529  $m\mu$ . These characteristics are distinguishing features of parahematis and hemochromogens, and the ferment is probably to be classified under the group of the b cytochromes.

The third substance is brownish red in colour, and has an absorption-band at 495  $m\mu$ . Its properties or possible functions have not been investigated.

### Description of Material for the Preparation of Verdoperoxidase.

The material employed for the preparation of verdoperoxidase in large quantities has been empyema from patients with tuberculosis. The empyema has been treated as soon as possible after the operation, generally within 2—3 hours.

The empyema shows, like pus of other origin, a dirty greenish colour. Direct spectroscopic examination in an ordinary test-tube before a strong lamp revealed relatively strong absorption-bands at 625 and 570  $m\mu$ . On reduction, two very sharp absorption-bands appeared at 637 and 559  $m\mu$ . With the intention of ascertaining whether the observed absorption-bands derived from formed elements or existed as a substance in the fluid, the following experiment was performed.

Centrifuging of empyema gave a deposit which consisted chiefly of cells and a relatively clear, yellowish green supernatant liquid. Both the deposit and the supernatant liquid showed the above-mentioned absorption-bands. The deposit was repeatedly washed with physiological sodium chloride solution. After centrifuging,

the cells in the centrifugate still showed the characteristic bands, while already the second washing liquid did not show these.

A microscopic examination of the preparation stained in Giemsa solution showed that the cells consisted mainly of leucocytes with polymorphic nuclei. A large number of these were in a state of degeneration with burst nuclei and cytoplasm.

Addition of freshly prepared Nadi-reagent (dimethylparaphenyldiamine +  $\alpha$ -naphthol) to a part of the empyema showed, if no hydrogen peroxide was added, no reaction; but the simultaneous addition of  $H_2O_2$  gave an intense blue colouring. The same experiment performed with a some days old reagent had another effect; the blue colouring being produced without the addition of hydrogen peroxide. This effect will be discussed later. The guaiac and the benzidine tests on peroxidase also gave positive results. The preparation showed only very weak catalase activity.

Examination of an almost limpid, cell-free pleuritic exudate showed no characteristic absorption-band. The peroxidase reactions gave negative results.

It is clear, from the above-stated facts, that verdoperoxidase is bound to the structure of the white blood corpuscles. By disintegration of the latter, however, the ferment can be released, and thus on examination be found also in the solution surrounding the leucocytes.

In order to exclude the possibility that the verdoperoxidase might be demonstrable as a conversion product of hemoglobin or similar substances only in pus, experiments were performed to ascertain whether the ferment occurs in leucocytes direct from the blood. An examination of leucocytes isolated from the blood of a case of myeloid leukemia showed these leucocytes to be very rich in verdoperoxidase.

The conclusion to be drawn from the above-described investigations is that verdoperoxidase is a ferment occurring in the leucocytes, catalyzing peroxidatic reactions.

### Method for the Determination of the Ferment Content.

In order to follow the content of V.P.O. in different fractions in connection with the preparation, use has been made of the characteristic absorption-bands of the ferment.

On page 34 will be found a description of the determinations of the absorption coefficients for the purest preparation at different wave-lengths. At  $637\text{ m}\mu$  the difference between the absorption coefficients for the oxidized and the reduced ferment is great, reaching a value of  $2.45 \times 10^7\text{ cm.}^2$  per gram-atom of ferment-bound iron in 1 ml. solution.

The light absorption for the material in which the content of V.P.O. had to be determined was measured at the wave-length  $637\text{ m}\mu$  in both oxidized and reduced states. From the difference was calculated the amount of ferment-bound iron, expressed in gram-atoms.

The accuracy of this method depends upon whether other substances were present whose light absorption at this wave-length was also changed on reduction. This was certainly the case as regards impure preparations, but the error, even here, was relatively small, since the light absorption in the red part of the spectrum, even with impure preparations, derived chiefly from V.P.O. After the elimination of coloured impurities, the correct values were obtained; these agreed well, all along the line, with the values expected from the measurements on purer material. The method of determining the absorption spectrum of a ferment in impure preparations as the difference between the oxidized and the reduced form has been employed e. g. by WARBURG and CHRISTIAN (1932) on the yellow ferment.

In this institution a photo-electric apparatus in principle according to WARBURG and NEGELEIN (1929) has been employed for light absorption measurements.

### Preparation of Pure Verdoperoxidase.

In connection with a number of preparations of V.P.O., different methods have been tried. The preparation described below exemplifies the method that has so far proved to give the best results.

*First step.* Precipitation in a layer between ether and ammonium sulphate solution.

To 850 ml. of empyema was added 1,500 ml. of distilled water and 850 ml. of ether. The mixture was shaken. 1,200 grams of ammonium sulphate was added, after which the solution was centrifuged. A yellow coloured ether layer was obtained on top;

under this was a relatively solid "cake", and at the bottom a clear, colourless solution. The ether and water phases were sucked off, after which the middle layer was dissolved in water.

The resulting solution, 3,100 ml., was very viscous and not quite clear. It contained  $7.2 \times 10^{-6}$  gram-atoms of ferment-bound iron, corresponding to about 400 mg. of pure V.P.O.

*Second step.* Purification with barium acetate.

In this case 400 ml. of saturated barium acetate solution was added to the solution, upon which large, white, heavy flakes were precipitated. The amount of barium acetate must for every preparation be ascertained by a preliminary test. Too much barium acetate must not be added, or the solution will become opalescent after centrifugation. The volume of the solution after centrifugation was 2,900 ml. The solution contained  $6.3 \times 10^{-6}$  gram-atoms of ferment-iron. Yield: 88 %.

*Third step.* Precipitation with ethyl alcohol.

To the above-mentioned solution of 2,900 ml. an equal volume of 95 % ethyl alcohol was added. After strong centrifuging, when a white deposit (3 A) was obtained, the volume of the yellow-green supernatant liquid was 5,500 ml. A further 1,500 ml. of alcohol was added, upon which a strongly green-coloured precipitate was obtained (3 B). This was dissolved after centrifugation in 150 ml. of distilled water. The solution contained  $4.4 \times 10^{-6}$  gram-atoms of ferment iron. Yield: 70 %. The mother liquid, which was red in colour, was evaporated at a low temperature and dialyzed (3 C).

*Fourth step.* Ammonium sulphate precipitation.

150 ml. of saturated ammonium sulphate was added to the solution 3 B. An almost colourless precipitate 4 A was formed. The solution was centrifuged. A further 150 ml. of ammonium sulphate was added to the mother liquid, a green precipitate being obtained (4 B). On the addition of a further 350 ml. of ammonium sulphate a red precipitate 4 C was obtained. The mother liquid, which was colourless, was discarded. Precipitation 4 B was dissolved in 50 ml. of distilled water; the colour was brownish green and the solution quite clear. The solution contained  $3.7 \times 10^{-6}$  gram-atoms of ferment iron. Yield: 84 %.

On dialysis with distilled water the preparation was precipitated almost completely, and was dissolved only after the



addition of salt (0.8 % sodium chloride solution). In connection with attempts to purify the preparation with the aid of cataphoresis, this method, at this degree of purity, proved unsuitable, as after the experiment the verdoperoxidase was found both in the fraction that migrated to the positive pole and in that migrating to the negative pole.

*Fifth step.* Ammonium sulphate — barium acetate treatment.

The preparation was precipitated with 60 % ammonium sulphate, centrifuged and dissolved in water, after which saturated barium acetate was added. Subsequent dialysis with distilled water resulted in only partial precipitation of the preparation.

*Sixth step.* Cataphoresis.

On cataphoresis with that part of the ferment which was soluble in distilled water, the preparation divided into two fractions, one migrating to the positive pole, faintly red in colour, and the other migrating to the negative pole. The boundaries of the latter fraction moved uniformly and with a constant speed. Cataphoresis was performed with the preparation dissolved in phosphate buffer pH 6.8; ionic strength 0.1; temp. 0° C. Electrophoretic mobility  $u = -4.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{volt}^{-1} \times \text{sec.}^{-1}$

The substance precipitated on dialysis with distilled water was subjected to renewed ammonium sulphate and barium acetate precipitation. On dialysis with distilled water a part of the preparation proved to be insoluble in a salt-free medium, while a part was so purified as to be soluble. The preparation was treated with such ammonium sulphate and barium acetate precipitations until most of it had been obtained in a form in which it was soluble in salt-free solution and migrated on cataphoresis with well defined boundaries and a constant speed. The treatment of the preparation with ammonium sulphate — barium acetate frees it from substances that are bound to it with great affinity, and give it other properties than those it has in a purer form.

The total quantity of material purified in this way was 140 mg., corresponding to  $2.5 \times 10^{-6}$  gram-atoms of ferment iron. 35 % of the original amount was obtained in yield. The preparation purified in the above described manner proved, on cataphoresis at pH 6.8, 8.5 and 10.6, to be completely homogeneous, which favours the assumption that the preparation is in a pure or almost pure state.

## Further Treatment of the Red Fractions.

*The precipitate 4 C.* The precipitate was dissolved in 30 ml. of distilled water; the solution had a strong red colour. It was treated with barium acetate in the manner that has already been described for the precipitate 4 D. The substance thus obtained has an absorption-band at 495  $m\mu$ . The properties of the preparation have not been further investigated.

*The solution 3 B.* To 30 ml. of the solution, which was reddish-brown in colour, were added small quantities of sodium chloride; it was then precipitated with 70 ml. of 95 % alcohol. A red, tough precipitate was obtained, which was easily soluble in water. The solution showed absorption-bands at 625 and 538  $m\mu$ .

---

The substances employed in the preparation were ammonium sulphate and barium acetate "pro analysi" SCHERING-KAHLBAUM. As the phosphate chemicals "pro analysi" were found to contain considerable amounts of iron and copper, it was necessary, before using them, to purify them. Monobasic sodium orthophosphate was dissolved in connection with warming. To this solution was added sodium diethyldithiocarbamate, the mixture being shaken with amyl alcohol in a separation funnel. The amyl alcohol was coloured dark brown. This procedure was repeated until the amyl alcohol remained colourless. The phosphate solution was washed with ethyl alcohol and warmed in a water-bath.

Cataphoresis was performed in an apparatus which has been described by TISELIUS (1937).

## Recapitulation of the Procedure.

1. 1 volume of empyema + 2 volumes of distilled water + 1 volume of ether + ammonium sulphate.
2. Addition of barium acetate.
3. Precipitation with ethyl alcohol.
  - a. 45 %: colourless precipitate;
  - b. 65 %: green precipitate;
  - c. red mother liquid, which is evaporated to small volume.
4. The precipitate 3 b is dissolved in water and precipitated with ammonium sulphate.
  - a. 50 % saturation: colourless precipitate;
  - b. 65 % saturation: green precipitate;
  - c. 80—90 % saturation: red precipitate.

5. Precipitate 4 b is dissolved in water and treated with ammonium sulphate and barium acetate until a substance soluble in distilled water is obtained.

6. Cataphoresis. Phosphate buffer: pH 6.8; ionic strength 0.1; temp. 0° C. The fraction with positive charge consists of a green substance = V.P.O.

### Analysis of Verdoperoxidase.

When purified in the manner described above, by shaking with ammonium sulphate and ether, precipitation with barium acetate and alcohol, followed by iterated treatment with ammonium sulphate and barium acetate, and, finally, by cataphoresis, the preparation is a brownish green substance soluble in distilled water.

#### Nitrogen Analyses.

The nitrogen content of the preparation was analysed with the micro-KJELDAHL method:

3.5 mg. prep. . . . .	0.601 mg. N
1.75 » » . . . . .	0.299 » N.

The nitrogen content thus amounted to 17.15 %.

#### Iron Analyses.

In the metal analyses combustion to ash at a high temperature was avoided, the preparation instead being combusted in sulphuric acid. The determination of iron was made in all essentials according to the procedure described by HEILMEYER and PLÖTNER (1937). The analyses were carried out as follows:

Samples of V. P. O. and Fe-standard were evaporated to dryness in quartz tubes of 20 mm. in height, 10 mm. in width and provided with round bottoms. 0.2 ml. conc. sulphuric acid was added, and the tubes were placed in a sand-bath. Platinum wire, 0.25 mm. in diameter, was wound round the tubes, above the surface of the sulphuric acid. The platinum wire was connected with a source of current. In the lumen of the tube was placed a fine pipette connected with a suction-pump to enable an effective evacuation of the sulphuric acid steams. Before the sand-bath was heated up, a current of 3—4 ampères was sent through the

platinum wire. The sand-bath was then heated to 200°—250° C. and the temperature controlled with a thermometer. A couple of drops of perhydrol were added. By means of the platinum wire winding the sulphuric acid was prevented from "creeping up" the walls of the tubes, as this would render the determinations uncertain. When the combustion was finished and all the sulphuric acid was evaporated, the heating was discontinued.

To each tube was added 0.5 ml. 0.75 n. sulphuric acid and one drop of 1 % parantrophol, followed by the addition of as much 1 n. ammonia as was necessary for neutralization. 1 drop of 1 % phenantroline, 1 drop of 1 % hydroquinone and a couple of grains of sodium hydrosulphite were added. If the colouring was strong the content of the tubes was diluted with redistilled water. The intensity of the red colour caused by the ferrophenantroline compound was determined by using a Zeiss "Stufen-photometer" (filter S 50), microcuvettes of 5 cm. in length being employed. The extinction coefficients  $E$ . were calculated.

As the iron content was determined in solutions of different final volumes, the value obtained was recalculated to refer to a dilution of 1 ml.,  $E_{\text{corr}}$ . (Table I.)

Table I.

	$E_{\text{corr}}$ .	$\frac{E_{\text{test}}}{E_{\text{blank test}}}$	$\mu\text{g. Fe calculated}$
1.4 mg. V. P. O. . . . .	1.37	1.10	1.38
0.7 mg. V. P. O. . . . .	0.81	0.54	0.69
2.03 $\mu\text{g. Fe}$ . . . . .	1.88	1.61	—
1.01 $\mu\text{g. Fe}$ . . . . .	1.01	0.74	—
0.05 $\mu\text{g. Fe}$ . . . . .	0.67	0.40	—
Blank test . . . . .	0.29	—	—
Blank test . . . . .	0.26	—	—

The iron content was found to be 0.1 %, corresponding to  $1.8 \times 10^{-5}$  gram-atoms per gram of preparation.

#### Copper Analyses.

Copper was found to be present in the preparation by addition of sodium diethyldithiocarbamate. The quantitative deter-

mination was carried out according to a method described by WARBURG (1927). This method is based upon the catalyzing effect of copper ions upon the aerobic oxidation of cystein.

The combustion of material took place in the manner described in connection with the iron determination. When the sulphuric acid had evaporated, 0.1 ml. 1 n. hydrochloric acid was added. The hydrochloric acid was then transferred to the side-bulb of a WARBURG vessel. The tube in which the combustion had taken place was washed with 0.1 n. hydrochloric acid, and the washing fluid also transferred to the side-bulb. The vessel was placed in a warming cupboard and the solution was dried at 110° C.

SCHERING-KAHLBAUM'S preparations for the determination of copper according to WARBURG were employed. The determinations were carried out with amounts of reagents as given in the following table:

Table II. Air. 20.0 C.

Vessel	I	II	III	IV	V
Content of the capital room.	Sodium pyrophosphate 3.45 ml. m/5 pH 8.2.	→	→	→	→
Content of the side-bulb.	Cystein hydrochloride 6 mg.	→	→	→	→
	0.2 ml. HCl m/10.	→	→	→	→
	Blank test (combusted)	0.88 mg V. P. O. (combusted)	1.76 mg V. P. O. (combusted)	0.88 mg V. P. O. 0.12 µg Cu (combusted)	0.24 µg Cu (combusted)
Oxygen consumption in 20 min.	15.6 c. mm.	53.2 c. mm.	95.4 c. mm.	94.2 c. mm.	99.8 c. mm.
Difference: test — blank test.	—	37.6 c. mm.	79.8 c. mm.	78.6 c. mm.	84.2 c. mm.

Without previous combustion of the preparation a determination was made with the same method to ascertain the amount of copper that could be split off in acid solution.

Table III. Air. 20° C.

Vessel	I	II	III	IV	V
Content of the capital room.	Sodium pyrophosphate 3.45 ml m/5 pH. 8.2.	→	→	→	→
Content of the side-bulb.	Cystein hydrochloride 6 mg.	→	→	→	→
	0.2 ml. H Cl. m/10.	→	→	→	→
	—	0.88 mg V. P. O.	0.88 mg. V. P. O. 0.06 μg. Cu	0.12 μg. Cu	0.18 μg. Cu
Oxygen consumption in 20 min.	14.1 c. mm.	44.9 c. mm.	63.9 c. mm.	51.4 c. mm.	72.1 c. mm.
Difference: test—blank test.	—	30.8 c. mm.	49.8 c. mm.	37.3 c. mm.	58.0 c. mm.

From the results in the tables II and III the copper content was calculated as 0.0011 and 0.0009 % respectively, corresponding to  $0.16 \cdot 10^{-5}$  gr. atoms per gr. preparation.

### Measurement of Light Absorption.

The light absorption at different wave-lengths was determined with the photo-electric apparatus of the Institute, built in all essentials according to WARBURG and NEGELEIN (1929). As a source of light for wave-lengths above  $400 \text{ m}\mu$  we used a lamp of 8 ampères 12 volts; current was supplied to the lamp from an accumulator. The absorption in the ultra-violet region was determined with a hydrogen discharge vacuum tube as source of light. A potassium-cesium photo-cell filled with argon was used in the determinations in the wave-length region above  $560 \text{ m}\mu$  and a potassium photo-cell filled with argon for the region below  $560 \text{ m}\mu$ .

The absorption coefficient was calculated from the formula

$$\beta = \ln \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \text{ cm}^2/\text{gr.-atom of iron.}$$

$I_0$  represents the intensity of the incident light and  $I$  the intensity of the transmitted light.

$d$  = the layer thickness in cm.

$c$  = gram-atoms Fe/ml.

As the preparation was found to contain 0.1 % of iron and

this, for reasons that will be discussed later, was considered to be porphyrin-bound in the oxido-reducible, colour-conditioning group, the concentration was expressed in gram-atoms of iron.

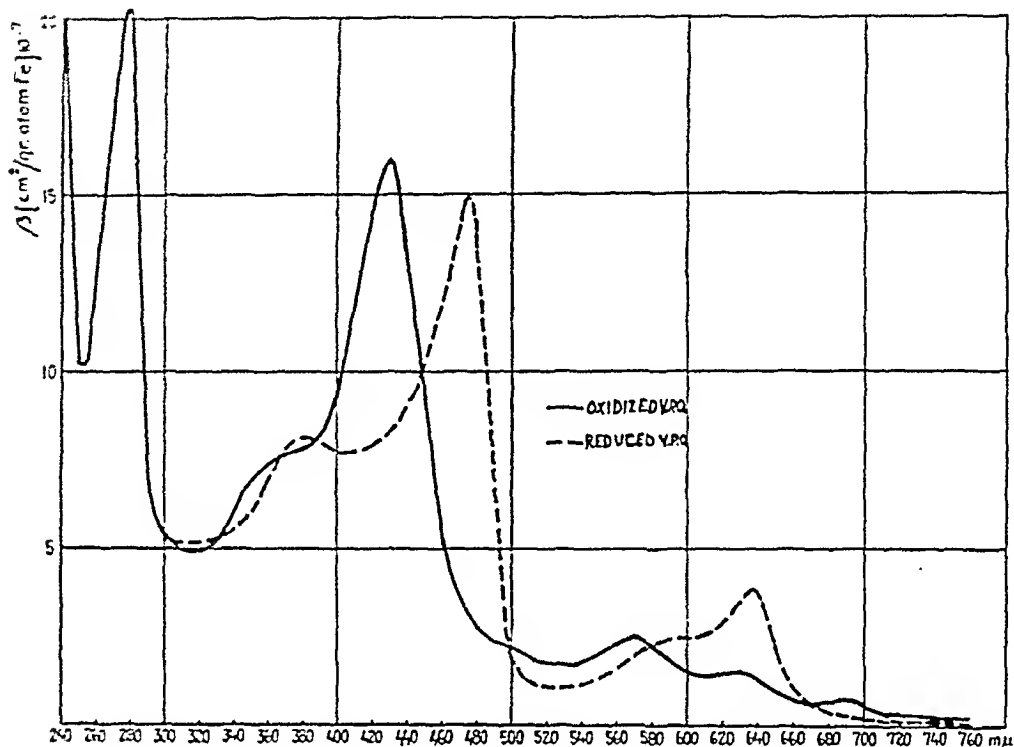


Fig. 1. Spectra of oxidized and reduced verdoperoxidase preparation.

According to the light-absorption measurements for V.P.O. (fig. 1), this has, in the oxidized form, 7 absorption-bands, of which the three in the wave-length region above 500  $m\mu$  are clearly observable with the spectroscope. The absorption-band at 570  $m\mu$  is most conspicuous. At 625 and 690  $m\mu$  two other bands are observable, but not so strongly marked. At 490—500  $m\mu$  one sees only a faint shadow, and the band at 430  $m\mu$  is observed only as an end-absorption in blue.

This band, SORET'S band, is characteristic of porphyrins and is found in the absorption curves for all the examined substances containing iron-porphyrin groups. The value  $16.1 \times 10^7$  cm/gr. atom of iron is of the same order of magnitude as for the  $\gamma$ -band of other hemin catalysts e. g. for catalase  $\beta_{400} = 19.6 \cdot 10^7$  (AGNER, 1938), for peroxidase "II"  $\beta_{400} = 18 \cdot 10^7$  (THEORELL 1941) and for cytochrome c  $\beta_{413} = 27 \cdot 10^7$  (THEORELL and ÅKESSON 1941).

The absorption spectrum for the reduced V. P. O. was measured for the ferment solution that was used in the determination of "the reduction equivalent". (Page 37.) On the reduction, a distinct absorption-band with a maximum at  $637\text{ m}\mu$  appears. The max. of the SORET-band shifts to  $475\text{ m}\mu$ , while retaining its intensity. The absorption-curve shows a max. at  $590\text{ m}\mu$ , at which wave-length, however, no band could be observed spectroscopically. The absorption-bands in the ultra-violet region correspond to those of the oxidized form.

### Determination of the Reduction Equivalent.

In order to decide whether the iron-content in the preparation corresponds to the concentration of the colour-conditioning group, the following experiment was performed:

To V.P.O. which had been oxidized completely at pH 4.5 was added, under anaerobic conditions, sodium hydrosulphite at the same time as the absorption change at  $637\text{ m}\mu$  was controlled. In this way it was possible to determine the least amount of hydrosulphite that was necessary for transition of the ferment from the oxidized to the reduced state. This amount was equivalent to the colour-conditioning group, and the value obtained could be compared with the iron and copper contents, which were determined in another way.

The arrangement of apparatus may be seen in fig. 2.

From a hydrogen bomb A, hydrogen gas was led through a 1 m. long quartz tube B, containing a platinum plate with a large surface. The quartz tube was heated with a gas flame C. The gas was conducted to a bottle D, which contained alkaline hydroquinone solution. The "wash-bottle" D was provided with an arrangement which allowed of the addition of hydroquinone to the alkaline solution after the removal of the oxygen.

Of two tubes from the bottle D, one led to the cuvette E and the other to the supply vessel F. The cuvette E was a 10 mm. long glass tube with smooth polished edges. The mouths were covered with quartz plates. The total volume of the cuvette was about 4 ml., but it was filled with only 3.5 ml. of solution. In the bottom of the cuvette and in its upper part above the surface of the solution were introduced tubes for the bubbling through of hydrogen. The gas was removed from the cuvette through a third tube with a very narrow lumen. All the tubes



leading to the cuvette were provided with taps. By means of this arrangement hydrogen could be bubbled either through the solution or only conducted above the same. From the wash-bottle D one could also conduct the hydrogen to the supply vessel F. This consisted of a bottle that was at least half filled

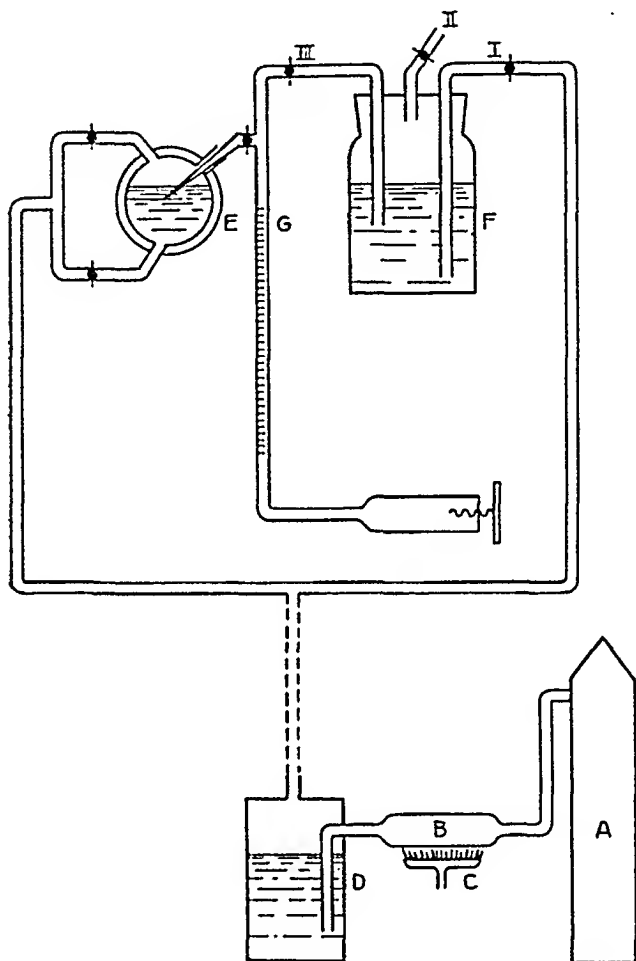


Fig. 2.

with water. The water had previously been freed from the oxygen physically dissolved. The gas was conducted through a tube I, which ended at the bottom of the bottle, and was removed through a tube II, from the upper part of the bottle. A third tube III allowed of the conduction of fluid to the burette G. By bubbling hydrogen through the water for an hour the latter was freed from oxygen. A certain weighed amount of hydrosulphite had before the experiment been placed in a basin in the upper

part of the bottle. By means of a special arrangement the basin was now tipped into the water and the hydrosulphite was dissolved. This solution was employed for the filling of micro-burette G.

The point of the burette was introduced into the cuvette E through the outlet tube of the latter. By means of a suitable arrangement of taps the stream of hydrogen and the re-filling of the burette could be regulated. In order to determine the amount of the preparation that had been reduced by different additions of hydrosulphite, the increase of light absorption at  $637\text{ m}\mu$  was measured in the already mentioned photo-electric apparatus.

The experiment was carried out as follows:

The bottle F was first freed from oxygen, the hydrosulphite was dissolved in water and the burette filled with hydrosulphite solution. The cuvette C was filled with 3.5 ml. solution, containing a determined amount of V.P.O., and hydrogen gas was bubbled through. When the solution was considered to be free from oxygen, the hydrogen was conducted above the solution in order to prevent oxygen from diffusing in through the tube through which the point of the burette was introduced. Small quantities of hydrosulphite were added from the burette, and the amount of reduced ferment was determined by measuring the increase in absorption at  $637\text{ m}\mu$ .

The titration result is reproduced in figure 3.

As may be seen from the figure, the increase of the extinction coefficient was directly proportional to the amount of hydrosulphite added. In certain cases, as in the one shown here, the hydrosulphite was used up before change of colour and absorption was noticed. In how far this may be caused by the presence of traces of oxygen or is due to other circumstances cannot yet be decided. In other experiments the change in the spectrum began to appear from the very beginning of the hydrosulphite addition. In any case, the amount of hydrosulphite used up from exactly the beginning of the spectral change to the definite conclusion, gives the titre for the coloured group of the chromoproteid.

The amount of hydrosulphite used for reduction of V.P.O. was compared with the amount that was employed for the reduction of a certain quantity of ferri-ions.  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl, 0.05 %, was dissolved in an iron standard solution. In the previously mentioned cuvette hydrogen was bubbled through a determined

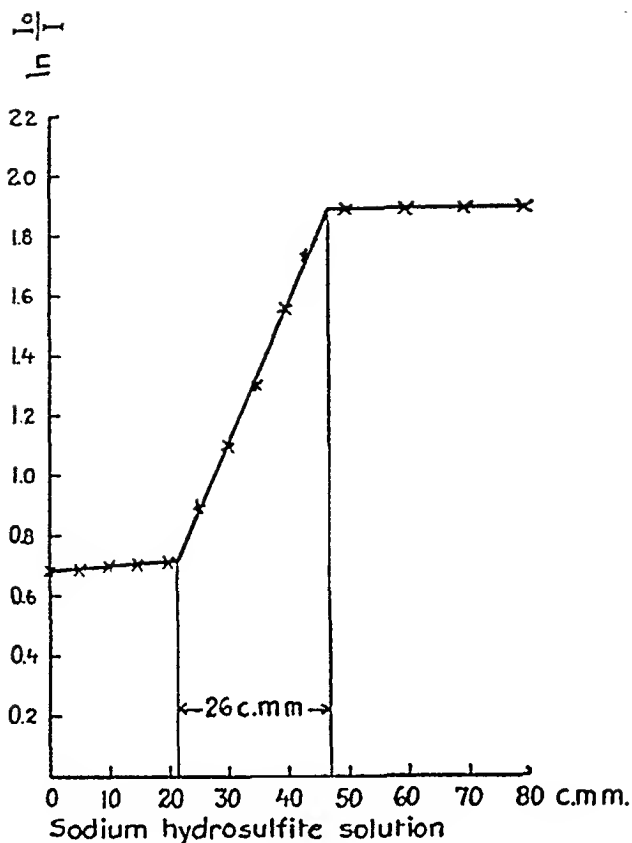


Fig. 3.

amount of the solution, and when this could be considered free from oxygen, titration with hydrosulphite was carried out. The increase in the concentration of the red ferro- $\alpha\alpha'$ -dipyridyl was measured spectroscopically at the wave-length 522  $\mu$ . (Fig. 4.)

Table IV.

	Sodium hydrosulphite c. mm.
8.05 mg. V. P. O. . . . .	26
10.2 $\mu$ g. $\text{Fe}^{+++}$ ( $1.83 \cdot 10^{-7}$ gr. atoms) . . . . .	30

From the results in table IV the metal content in the preparation was calculated as  $1.97 \times 10^{-5}$  gr.-atoms per gr. dry substance, which value agreed, as closely as could be expected, with that which was obtained in the direct iron

determination viz.  $1.8 \times 10^{-5}$  gr.-atoms Fe/gr. substance. These values support the assumption that the colour-conditioning group is an iron porphyrin compound. Copper, on the other hand, cannot be contained in this group, since the total content,  $0.16 \times 10^{-5}$  gr.-atoms per gr. substance, is obviously too low to be able to correspond to the oxido-reduction equivalent. The copper is probably an accidental constituent, as has been shown in the case of catalase (AGNER, 1939) and cytochrome peroxidase (ALTSCHUL, ABRAMS and HOGNESS, 1940).

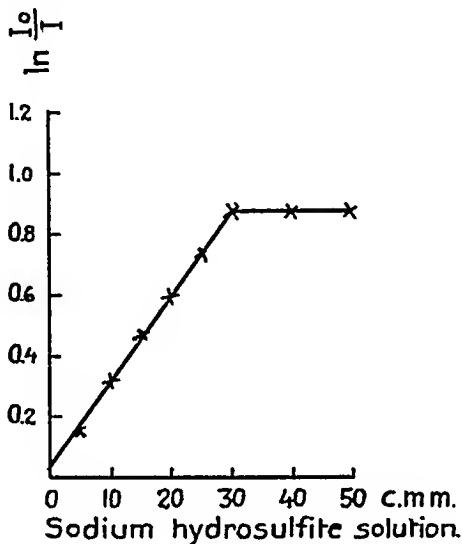


Fig. 4.

### Spectroscopic Investigations.

The position of the absorption-bands in solutions containing verdoperoxidase has been measured with a ZEISS hand-spectroscope. The concentration of the ferment has generally been 0.5—1.0 %, and the thickness of the layer about 1 cm.

#### *Oxidized and reduced V. P. O.*

In the oxidized state, V. P. O. showed four absorption-bands in the visible part of the spectrum: at 690, 625, 570 and (500)  $m\mu$ , and end-absorption in blue from 465  $m\mu$ . On addition of sodium hydrosulphite, a brownish green solution of the oxidized ferment turned bright green, and the absorption spectrum was replaced by two bands at 637 and 475  $m\mu$ . If a solution of V. P. O. was stored in the oxidized form in closed glass vessels, one observed a similar gradually appearing change of the colour and of the ab-

sorption-bands, which extended for weeks from the parts nearest the bottom upwards. If a stream of oxygen-gas was conducted through the solution the reduced ferment was oxidized very gradually if the degree of acidity of the solution had a pH value greater than 5; if the value was lower than 5 the ferment was oxidized immediately.

Verdoperoxidase is thus a substance that can be oxidized and reduced reversibly, and that in the oxidized and reduced forms has different absorption-bands. In solutions with a hydrogen-ion concentration lower than  $10^{-5}$ , the ferment gradually goes over to the reduced state, while it is autoxidizable in more acid solutions.

#### *Peroxiide compound.*

Small quantities of hydrogen peroxide were added to a solution containing reduced V. P. O. The colour then changed to brownish green, and the characteristic bands for the oxidized ferment were observed. On the further addition of hydrogen peroxide, the solution turned green, and had a distinct absorption-band at  $625\text{ m}\mu$ . This compound was unstable, and gradually disintegrated, with liberation of the peroxidase in oxidized form. At a hydrogen peroxide concentration of  $m/20$ , the absorption-band disappeared and the ferment was destroyed.

If hydroquinone was added to the peroxide compound, this led to the re-formation of verdoperoxidase in the oxidized state, while at the same time the hydroquinone was oxidized, turning red in the process.

Hydrogen peroxide thus oxidizes the reduced ferment, forming with the oxidized form a peroxide compound. The peroxide compound oxidizes e. g. hydroquinone, and the ferment returns to its oxidized form. In this, the ferment reacts in the same way as plant-peroxidases, and the spectroscopic observations explain later described functions of the ferment.

#### *Compounds with HCN, H<sub>2</sub>NOH, NaN<sub>3</sub>.*

Like certain other ferments which as a prosthetic group contain iron-porphyrin compounds, V. P. O. also formed compounds with cyanide and azide ions and with hydroxylamine.

Solutions of the oxidized form of V. P. O., on addition of hydrogen cyanide (KCN + equivalent HCl), changed to clear green in colour, and absorption-bands were observed at  $634$  and  $458\text{ m}\mu$ . Compared with the reduced form of V. P. O., these bands thus showed a displacement of  $3$  and  $17\text{ m}\mu$  respectively to the short-wave part of the spectrum.

The hydroxylamine compound of the verdoperoxidase was green in colour, and had absorption-bands at 628 and 460  $m\mu$ . If sodium hydrosulphite was added one observed first a broad band between 628 and 637  $m\mu$ , and thereafter only a narrower one at 637  $m\mu$ .

This shows that the reduction of the hydroxylamine compound does not take place instantaneously, but requires a certain time, during which a mixed spectrum can be observed.

Addition of sodium azide gave, with the oxidized form of verdoperoxidase, no spectroscopically observable change. On addition of hydrosulphite to a solution of sodium azide and V. P. O., the spectrum for the reduced V. P. O. first appeared. The absorption-band was then displaced from 637  $m\mu$  to 615  $m\mu$ . The band in blue was situated at 460  $m\mu$ .

The sodium azide obviously does not form any compound with the oxidized form of verdoperoxidase; not until the latter has been reduced does a V. P. O.-azide compound appear. The result is thus remarkable, as the azide ion generally forms compounds with substances in which the hemin-bound iron is in the highest oxidation stage. The observation must be made the subject of further investigations.

*Experiments with carbon monoxide and sodium fluoride.*

Carbon monoxide did not form any spectroscopically observable compound, either with the oxidized or the reduced form of V. P. O., nor could such a compound be observed with fluoride.

**Survey of the Spectroscopic Results.**

Table V.

V. P. O. <sub>ox.</sub> . . . . .		690, 625, 570, (500) $m\mu$
V. P. O. <sub>red.</sub> . . . . .		637, 475 $m\mu$ .
V. P. O. <sub>ox.</sub> . . . . .	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	625 $m\mu$ .
V. P. O. <sub>ox.</sub> . . . . .	+ HCN	634, 458 $m\mu$ .
V. P. O. <sub>ox.</sub> . . . . .	+ H <sub>2</sub> NOH	628, 460 $m\mu$ .
V. P. O. <sub>red.</sub> . . . . .	+ NaN <sub>3</sub>	615, 460 $m\mu$ ,
V. P. O. <sub>ox., red.</sub> . . . . .	+ NaF	As V. P. O. <sub>ox., red.</sub>
V. P. O. <sub>ox., red.</sub> . . . . .	+ CO	As V. P. O. <sub>ox., red.</sub>

*Attempt to split V. P. O.*

A solution of verdoperoxidase was dripped into acetone to which HCl had been added (1 part of conc. HCl to 1,000 parts of acetone). The ferment was precipitated without the colour-con-

ditioning group being split off. As in the case of cytochrome c, the prosthetic group is obviously very firmly bound to the protein, and the verdoperoxidase differs, herein, from the hemin proteids, hemoglobin, catalase and horse radish peroxidase II.

### Activity Determinations.

The isolated, green coloured substance has proved, according to previously mentioned analysis results, to be a proteid with a prosthetic group consisting of an iron-porphyrin compound. Several substances which have previously been isolated and described are constructed in a similar way, and have several different functions to fulfil in oxidative metabolism. They serve as electron transporters — cytochromes; hydrogen peroxide splitting activators — catalases, as activators of oxygen in peroxide compounds — peroxidases and as oxygen-transmitting enzymes. Experimental investigations have been made, to ascertain whether the isolated substance catalyzes reactions similarly to any of the above-mentioned substances.

Whether the ferment, which is oxido-reducible, can serve as a cytochrome in the cells depends on the value of the oxido-reduction potential. As this has not yet been determined, the question must be left open.

The capacity of the preparation to act as an "activator of oxygen" was investigated by measuring the amount of oxygen-gas that was consumed in the oxidation of a substrate in the presence of the ferment. In spectroscopic investigations it had proved that the ferment was autoxidizable in solutions with pH-values under 5, and that it was not autoxidizable in neutral or alkaline solutions. Experiments were therefore carried out with the substrate dissolved both in phosphate buffers and acetate buffers at pH 6.8 and 4.5 respectively. WARBURG vessels were used in the experiments, and the consumption of oxygen-gas was determined at 20° C. Up to 15  $\mu$ g ferment was used for 3.65 ml. solution of the substrates (m/500). Phenol, pyrocatechol, resorcinol, hydroquinone, pyrogallol, tyrosine, paraphenyldiamine and ascorbic acid were all tried as substrates. In no case was the consumption of oxygen-gas greater than the amount that was used for the autoxidation of the substrate.

Besides the substrates mentioned, dihydroxymaleic acid was

also tried. In these experiments the ferment was found to cause oxygen consumption, as THEORELL and SWEDIN (1939; 1940) found to be the case with plant-peroxidase. This effect was inhibited, as in the experiments with plant-peroxidases, by catalase. The isolated ferment, as has already been mentioned, has a peroxidase effect. This effect will be dealt with in greater detail later. It is noteworthy that the dihydroxymaleic acid oxidation is catalyzed by this peroxidase. This observation supports THEORELL's view that "the dihydroxymaleic acid oxidase" is not an oxidase in the strict sense, but that the dihydroxymaleic acid oxidation is catalyzed by substances having a peroxidase effect. — An attempt was made to work out a method for the determination of activity by measuring the oxygen-gas consumption in this reaction catalyzed by the ferment. The effect of the enzyme was relatively strong (10  $\mu$ g. caused an oxygen consumption of about 11 c.mm. in 5 minutes), but since one did not always obtain values that were completely reproduceable and proportional to the ferment concentration the method was not considered suitable.

The catalase activity, Kat. f., was determined for the preparation and proved to be quite insignificant about 5, which corresponds to 1/10,000 of the value for catalase.

In the description of the primary material from which the verdoperoxidase was prepared it has been mentioned that this showed a positive result on being tested with the ordinary peroxidase reagents (the NADI-reagent, guaiac tincture or benzidine + hydrogen peroxide). The first preparation, however, was not investigated in respect of this effect. At first, when a relatively pure ferment was prepared, and shown to have a peroxidase capacity, the original materials were also tested.

The observation that the ferment formed a spectroscopically observable compound with hydrogen peroxide, which was able to oxidize substrates like hydroquinone, has already been mentioned.

To what extent the V. P. O.-peroxide compound was able to oxidize other substances was investigated in experiments where the ferment was for a certain time allowed to act upon substrate + hydrogen peroxide in a WARBURG vessel with two side bulbs. The amount of hydrogen peroxide that after a certain time had not been used up was determined by measuring the development of oxygen-gas when catalase was added. The capital room of the WARBURG vessel contained hydrogen peroxide m/350 and the substrate m/350 that was to be investigated, one of the side



bulbs 10  $\mu\text{g}$  V. P. O. and the other 50  $\mu\text{g}$  catalase. V. P. O. was mixed with the substrate, and two minutes afterwards catalase was added. The development of oxygen-gas was measured manometrically. In table VI will be found the results of the determinations.

Table VI.

Substrate	Blank test	Phenol	Hydroquinone	Resorcinol	Pyrocatechol	Pyrogallol	Paraphenyldiamine	Benzidine	Tyrosine	Sulphanilamide	Ethyl alcohol	Ascorbic acid
c. mm. O <sub>2</sub> enveloped . . . . . (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> remaining unused)	215	206	143	190	115	125	151	184	207	203	220	130
Peroxidase activity . . . . .	—	0	++	+	+++	+++	++	+	0	0	0	+++

As may be seen from the table pyrocatechol, pyrogallol, hydroquinone, paraphenyldiamine and ascorbic acid are substances that are easily oxidized. Less easily oxidized are resorcinol and benzidine, while phenol, tyrosine, sulphanilamide and ethyl alcohol are not oxidized. To draw the conclusion that these latter substances are not oxidized at all in a system in which V. P. O. is a constituent would of course not be justified by these experiments. One can only constate that under the conditions under which these experiments were carried out, oxidation did not take place.

Of the substances which were oxidized by the V. P. O.-peroxide compound in the foregoing experiments, pyrogallol is used in the activity determinations on peroxidase according to WILLSTÄTTER and STOLL (1918). The suggestion of KEILIN and MANN (1937) to use a total volume of 500 ml. instead of 2,000 ml. was followed.

The activity determinations were thus carried out as follows: a solution of a definite amount of ferment was added to 500 ml. of a solution, 20° C., containing 0.25 % pyrogallol and 0.0025 % hydrogen peroxide. After 5 minutes the ferment reaction was interrupted by the addition of sulphuric acid. The purpurogalline that was formed was shaken out with ether and the amount was colorimetrically determined. A solution of crystalline purpurogalline was used as a standard.

The activity of a ferment preparation is expressed in purpurogalline number (P. Z.). The purpurogalline number is given as mg. of purpurogalline formed from pyrogallol per 1 mg. of dry-weight of peroxidase preparation.

The colour development that was catalyzed by the ferment was investigated with the idea of ascertaining whether it was proportional to the ferment concentration and the time during which the reaction was allowed to proceed. (Fig. 5.)

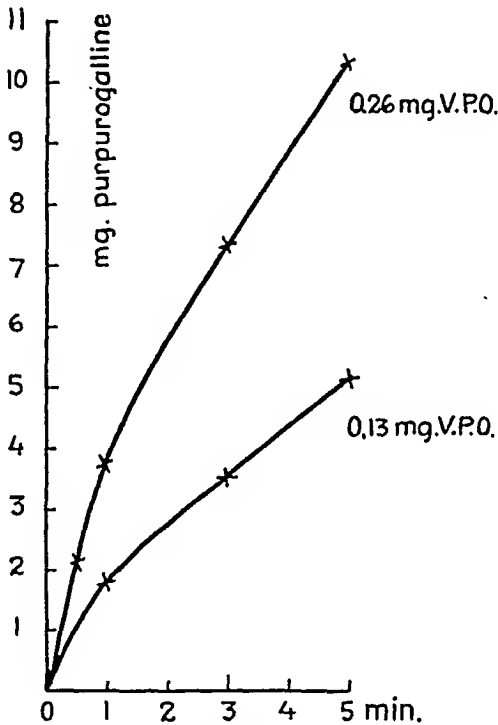


Fig. 5.

The experiments show that the colour development was greatest during the first minutes, and that it afterwards diminished. It has been shown spectroscopically that the ferment is destroyed by stronger concentrations of hydrogen peroxide. The reduction in the velocity of the reaction is perhaps to be explained by an inactivation of the ferment by hydrogen peroxide; but the inhibition may also conceivably have been caused by oxidation products. As, however, the amount of purpurogalline formed after different intervals of time is proportional to the ferment concentration, this reaction may be used for determinations of activity.

The purpurogalline number, "P. Z.", for the verdoperoxidase is calculated as 41. If the calculation is made by using the values



substances formed spectroscopically observable compounds. Sodium fluoride also inhibited V. P. O., but no compound could be observed here.

Carbon monoxide did not inhibit V. P. O., nor did it form compounds therewith.

A precipitation of V. P. O. with a mixture of ethyl alcohol and formalin (70 and 10 % respectively) and an exposure to the action of these substances inactivated the ferment only slightly.

*Inactivation by heat.*

Tubes containing a solution of the ferment were lowered for 10 minutes into a water-bath which was adjusted for special temperatures, and the ferment activity was determined. (Table VIII).

Table VIII.

	Temperature	Time	mg. purpurogalline	% inhibition
0.260 mg V. P. O. . .	20°	10 min.	10.3	—
› . .	60°	›	10.2	0
› . .	70°	›	9.8	4.9
› . .	80°	›	9.6	6.4
› . .	90°	›	0	100

*pH stability.*

Table IX shows the inactivation of V. P. O. when acted upon by different hydrogen ion concentrations for 10 minutes.

Table IX.

	mg. purpurogalline	% inhibition
0.260 mg V. P. O. in 0.1 ml. solution + 0.2 ml. aq. dest . . .	10.3	—
› + 0.2 ml. NaOH n/1 . .	5.3	48
› + 0.2 ml. NaOH n/10 .	10.4	0
› + 0.2 ml. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> m/15	10.3	0
› + 0.2 ml. CH <sub>3</sub> COOH n/10	10.1	0
› + 0.2 ml. CH <sub>3</sub> COOH n/1	9.9	4
› + 0.2 ml. HCl n/10 . .	0	100
› + 0.2 ml. HCl n/1 . . .	0	100

The solutions were neutralized, before the determination of the activity, by the addition of an equivalent quantity of acid or alkali.

## The Preparation of Verdoperoxidase from White Blood Cells from a Patient with Myeloid Leukemia.

Patient: A woman, 45 years of age. Clinical diagnosis: myeloid leukemia. Blood status: red blood cells 2.75 million; hemoglobin 70 %; white blood cells 115,000.

Differential calculation: promyelocytes 8 %; myelocytes 30 %; metamyelocytes 12 %; rod forms 5 %; neutrophils 38 %; eosinophils 1 %; basophils 1 %; lymphocytes 3 %; monocytes 2 %.

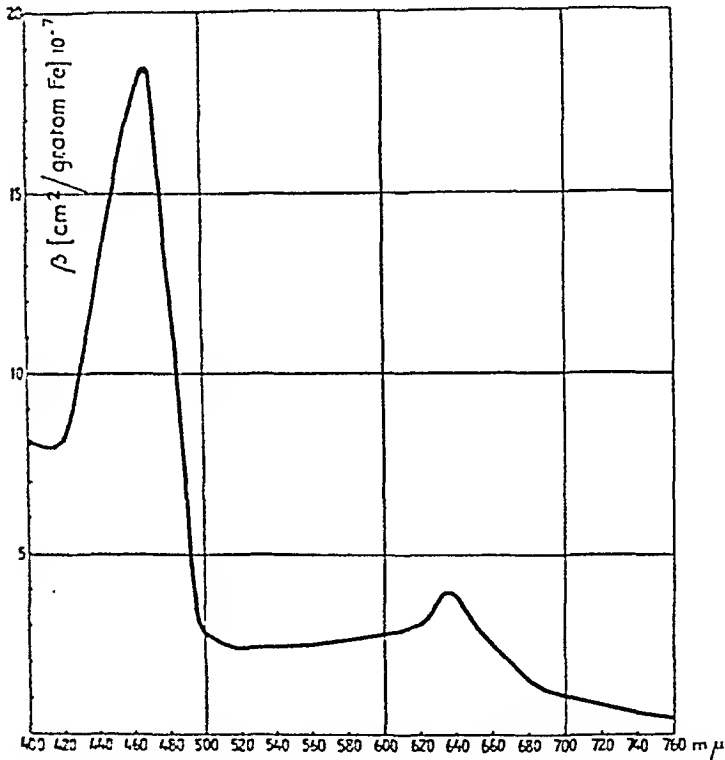


Fig. 6. Spectrum of reduced verdoperoxidase preparation from leucocytes.

Red blood corpuscles in 20 ml. heparinized blood sedimented for 1½ hours. The fluid above the erythrocytes was pipetted off and centrifuged. The red blood corpuscles were washed up again in serum and were once more sedimented for 1½ hours. The serum and the leucocytes contained therein were centrifuged. To the leucocytes obtained as deposit from these two centrifugations were added distilled water, ether and ammonium sulphate;

shaking. On centrifugation, a "cake" of precipitated substances was formed between the upper layer of ether and the water phase. This "cake" was washed up in water and barium acetate was added. After centrifuging, a yellow-green, clear solution which showed absorption-bands at 625 and 570  $m\mu$ , and which on reduction became green, with a distinct absorption-band at 637  $m\mu$ , was obtained. This solution also showed positive peroxidase reactions.

The values for the extinction coefficients before and after reduction with sodium hydrosulphite were determined. The difference was compared with that which was obtained for the "pure" verdoperoxidase preparation, according to the description already given. This comparison showed the content of ferment to be 1.35 mg./ml.; and as the whole volume was 2.2 ml., the total amount was 3 mg.

Figure 6 shows an absorption curve in the visible part of the spectrum for this preparation in the reduced state. The agreement with the absorption curve for V. P. O. from empyema is completely convincing.

The weight of the leucocytes was roughly estimated at 1 gr., corresponding to about 0.2 gr. of dry substance. The content of V. P. O. is thus not less than 1–2 % of the dry substance of the leucocytes.

One can form an idea of the strength of the peroxidase effect in leucocytes as compared with that in horse-radish root, the classical preparation material for plant-peroxidases, in the following way. Experiments in this institute (THEORELL) have shown that 8,000 P.U. (peroxidase units) can be extracted from 200 kg. of horse-radish, which agrees with the values given in other quarters (e. g. KEILIN and MANN). This thus gives 0.04 P.U. per gram of undried substance.

1 gram of leucocytes contains about 3 mg. of V.P.O. with P.Z. 75, if the initial activity, which can probably be regarded as physiological, is taken as the basis of the calculation. One obtains a value of 0.23 P.U. per gram of undried leucocytes. It appears from this that the peroxidase activity in leucocytes is about 6 times as strong as in horse-radish root, which is nevertheless known as one of the plant-parts that is richest in peroxidase, being excelled in this respect only by fig sap, according to SUMNER and HOWELL (1936).

## Demonstration of Verdoperoxidase in Chloroleukemic Infiltrates.<sup>1</sup>

Chloroleukemic infiltrates are characterized by, amongst other things, a greenish colour. The cause of this colour has hitherto been unknown, and it has been assumed that it must be due to a diffusible pigment.

In 1914, in a section from a case of chloroleukemia, great changes were observed, in the form of chloromatous, periosteal coatings, especially on the sternum. The sternum and the periosteal coatings were preserved, and have since been kept in KAYSERLING's fixative.

An approximately 1 cm. thick, greyish green section from the chloromatous coatings showed, in a recent spectroscopic examination, faint absorption-bands at 570 and 625  $m\mu$ . On the addition of hydrosulphite, the colour changed to clear green, and a strong absorption-band was observed at 637  $m\mu$ . The preparation had a strong peroxidase effect.

The greenish colour of chloroleukemic infiltrates is thus, at least partly, due to the presence of large amounts of verdoperoxidase. The resistance to the constituent substances of the fixative, a property of the verdoperoxidase that has been demonstrated by previously mentioned investigations, explains the survival, after 27 years, of the spectroscopically observed properties of the preparation and its peroxidase effect.

### Investigations on the Nadi-Reagent.

The verdoperoxidase, on different occasions, showed a very varying effect on the Nadi-reagent, and an investigation to ascertain the cause of this circumstance was therefore undertaken. The Nadi-reagent consists of a solution of dimethylparaphenylenediamine and  $\alpha$ -naphthol

V. P. O. was added to a newly prepared solution of Nadi-reagent. No colour reaction was observed. If small amounts of hydrogen peroxide were added, the solution immediately showed a blue colour. If a few hour old reagent was used instead of a fresh preparation of the same, a weak reaction was obtained;

<sup>1</sup> These investigations have been carried out and published with the kind permission of Professor Folke Henschen.

and if the reagent had been allowed to stand for twenty-four hours a relatively strong reaction was obtained. No reaction was observed if catalase was added to such a solution before the addition of V. P. O.

These experiments show that even in a relatively short time the reagent forms peroxides that on the addition of peroxidase are used for the reaction in which indophenol blue is formed. The variations in the formation of indophenol blue are thus due to the occurrence of larger or smaller amounts of hydrogen peroxide.

---



## Discussion.

The conception of the oxygen-activating capacity of animal tissues has been largely based on the previously mentioned experiments with Nadi-reagent. The formation of indophenol blue has been considered to be due to an oxidation of the constituent substances of the reagent, brought about by an oxidase in the tissues.

In my investigations it has been demonstrated that *the Nadi-reagent itself forms hydrogen peroxide on autoxidation*. This must be taken into consideration in the estimation of the indophenol formation, as the product of the reaction can be conceived as formed, partly or wholly, through a peroxidatic reaction.

An account has already been given of the conditions under which VERNON, using Nadi-reagent, carried out the determinations of the content of indophenol oxidase. With the idea of allowing the oxygen in the air to come into effective contact with the tissue oxidase, he arranged for a large contact surface between the air and the test-solution. However, this must also have contributed to an increase of hydrogen peroxide through autoxidation of the dimethylparaphenyldiamine, and this reaction may conceivably have contributed to the colour formation.

BATTELLI and STERN determined the oxidase content by measuring the consumption of oxygen gas catalyzed by the tissues. Their results agreed, on the whole, with those arrived at by VERNON. This agreement would indicate that the oxygen-activating ferment was the same as that which caused the formation of indophenol blue. The liver showed, however, in determinations with the Nadi-reagent, a low oxidase content, but in determinations of the oxygen consumption, on the other hand, a high oxidase content. The liver is the organ which has the highest catalase content. If a primary formation of hydrogen

peroxide is a necessary condition for the indophenol blue reaction, then the above-mentioned circumstance might be explained by an immediate disintegration by the liver catalase of the hydrogen peroxide necessary for the peroxidatic reaction.

As yet unpublished investigations in this institute, on the effect of the indophenol blue formation provoked by the addition of catalase to Nadi-reagent in which were placed different tissue-sections from the grey matter of the brain, musculature, kidneys etc., showed that the tissues in solutions without catalase took on a blue colour in comparison with which *samples containing catalase were practically colourless*.

HARRISON (1929) showed that a positive Nadi-reaction did not always necessarily depend on an activator of oxygen, but that it could be secondarily induced by peroxidase and hydrogen peroxide formed during the aerobic oxidation of such a system as xanthine oxidase and hypoxanthine. It did not strike him, however, that hydrogen peroxide might be formed in the reagent itself. He explained, for example, that a rose-purple colour that he observed immediately on adding the Nadi-reagent to solutions of milk peroxidase was due to the presence of peroxide in the peroxidase preparation. That the peroxidase preparation contains peroxides in such concentration as to cause a colour change is scarcely likely. The observation is probably to be explained as being due to the occurrence of hydrogen peroxide in the reagent.

It is obvious that the formation of indophenol blue from the Nadi-reagent must be explained as being, in any case partly, due to peroxidase reactions. Whether it is only due to these, or whether indophenol blue is also formed direct through catalysis of an oxidase or, according to KEILIN, through cytochrome + cytochrome oxidase, can, however, not yet be decided with certainty. The strong inhibition of the tissue-N<sub>2</sub>-reaction by catalase that we have already demonstrated speaks, however, strongly in favour of the assumption that *the reaction is of peroxidatic quality*.

The positive Nadi-reaction with leucocytes has generally been interpreted as being due to an oxidase. It is clear, from the above discussion concerning the formation of indophenol blue, that it can be provoked by peroxidatic reactions.

The reaction to demonstrate the oxygen-activating ferment in leucocytes with Nadi-reagent is generally carried out with alcohol-formalin fixed preparations. In my investigations, the purified verdoperoxidase has proved, curiously enough, to be resistant to alcohol-formalin. — The staining is carried out in alkaline solutions or with Nadi-reagent, which according to the instructions should not be used until twenty-four hours after its preparation. V.P.O. is not inactivated by n/10 alkali during the period used for the carrying out of the staining. In such strong alkali the autoxidation is great (investigations by BATTELLI and STERN and others), and hydrogen peroxide is then formed with great rapidity. In a neutral solution of the Nadi-reagent the formation of hydrogen peroxide takes place more slowly, and the concentration necessary for the staining has probably not been reached until after the lapse of a certain time. The addition of catalase to the Nadi-reagent a minute or so before the staining inhibits the formation of indophenol blue in the leucocytes.

All of these reasons speak in favour of the assumption that *the Nadi-reaction in the leucocytes is conditioned by verdoperoxidase.*

Verdoperoxidase has been isolated from leucocytes from the blood and from pus, and has been demonstrated in chloroleukemic infiltrates. Investigations have also been carried out on the presence of V.P.O. in other tissues, e. g. lymph glands both from healthy and from tuberculous animals; but we have not been able to obtain any preparation from these sources showing the absorption-bands and effects characteristic of V.P.O. As has been shown in the foregoing pages, verdoperoxidase provokes the so-called myelo-Nadi-reaction, which according to data in the literature, and as the name itself indicates, is characteristic of myeloic cells.

The writer's own investigations together with the data from the literature thus show that, according to our present knowledge *verdoperoxidase is a ferment that occurs only in myeloic cells.*

Verdoperoxidase is a high molecular substance consisting of protein to which an iron-porphyrin compound is firmly bound. Preliminary investigations with cataphoresis have shown that the ferment has a basic character, I.P. > pH 10: As has already

been mentioned in connection with the preparation of V.P.O., the ferment in impure preparation is bound so fast to certain acid substances that despite its basic properties, in investigations with cataphoresis, it has been found, partly to accompany these substances. Certain investigators have found that the active substance from leucocytes, with what they sometimes call oxidase effect, and sometimes peroxidase effect, has not been preparatively separable from nucleic acids, and they have asserted that the activity was caused by nucleoproteids.

The prosthetic group is an iron-porphyrin compound of hitherto unknown constitution. Compared with substances with certain similar characteristics, it is conceivable that V. P. O. contains hemin groups with oxidized side-chains.

The reduced verdoperoxidase and the cyanide compound of the oxidized form show absorption-bands (637 and 634  $m\mu$  respectively) situated in the wave-length region in which WARBURG et al. and KEILIN formerly found absorption-bands belonging to certain substances mentioned in the foregoing pages. In suspensions of *Bact. pasteurianum* poisoned with hydrogen cyanide, WARBURG et al. showed an absorption-band at 640  $m\mu$ , and considered this to be due to the cyanide compound of an oxygen-transmitting ferment. KEILIN, however, has declared that this, as well as certain other substances with similar spectra observed by him, has not an oxygen-activating function, but that they are derivatives of cytochrome a. They have been called cytochrome  $a_2$ .

If the occurrence of verdoperoxidase in leucocytes had only been ascertainable by spectroscopic investigations, and the properties and function of the ferment had not been described to such an extent, it would, according to KEILIN, have been considered as a cytochrome and been classified with the  $a_2$  group!

As the function of the substances demonstrated by WARBURG et al. and KEILIN is not known, and as they show, spectroscopically, great similarity to verdoperoxidase, it is perhaps permissible to venture the thought that their effect is neither that of a cytochrome nor of an oxygen-transmitting ferment, but that their function is peroxidatic.

Peroxidases, isolated from different materials, exemplify the fact that ferments in different tissues may be constructed in

different ways and yet have similar functions. Horse-radish has been found to contain two different peroxidases, peroxidase I and peroxidase II. The cytochrome peroxidase from yeast has a spectrum similar to that of "plant-peroxidase", but quite a different function; and verdoperoxidase, finally, differs essentially from the other peroxidases both as regards structure and properties.

In the present work, the function of verdoperoxidase cannot be completely stated, as the investigations to date have only shown that it has a peroxidase effect; and the physiological significance of the ferment is as yet uninvestigated.

The data in the literature concerning the demonstration of peroxidase (generally called oxidase) in serum have been regarded by previous investigators as of a certain importance. So, for example, horse-serum, after the immunization of the animal with diphtheria toxin, was shown to have a high "oxidase content", and this "oxidase" was supposed to contribute to the therapeutic effect. In a later work, MÖLLERSTRÖM (1928) has followed the peroxidase content in serum in infections, and found that it was increased. As an explanation of these observations, it is conceivable that the leucocytes are disintegrated by toxic influence and verdoperoxidase is liberated. The observation discussed on pages 24 and 25, that in the destruction of the leucocytes in empyema verdoperoxidase is liberated, being found in the fluid surrounding the white blood corpuscles, speaks in favour of this assumption. Whether such an appearance of peroxidase in serum is of importance for the combatting of infections, it is of course impossible to say, owing to the incompleteness of the investigations so far carried out.

Among the current remedies for the treatment of infectious diseases, sulphanilamide preparations have a prominent place. It is generally assumed that the sulphanilamide as such is not active, but that a derivative thereof, arising by its oxidation in the organism, has the toxin-combatting effect. In vitro, such an oxidation product is most easily obtained through a peroxidatic reaction, catalyzed by ferro-compounds. It is possible that the occurrence of the oxidized product in the organism is also caused by a peroxidatic reaction, and that the verdoperoxidase catalyzes this. This assumption finds support in the clinical

discovery that the sulphanilamide has the strongest therapeutic effect in leucocytosis. In my experimental investigations (page 44), may be found an account of an attempt to oxidize sulphanilamide with verdoperoxidase + hydrogen peroxide. No effect was obtained, but the experiment was carried out under such conditions that one is not entitled to ascribe too much weight to the result. Only continued investigations under more physiological conditions may possibly yield an answer to the question as to whether verdoperoxidase has any importance for the oxidation of sulphanilamide and similar substances.

---

## Summary.

A green-coloured ferment with characteristic absorption-bands and peroxidase effect has been isolated and produced in pure or almost pure form from leucocyte-rich material. The isolated ferment has been called *verdoperoxidase*, abbreviated to V.P.O.

It has been possible to demonstrate the presence of verdoperoxidase only in myeloic cells. The ferment content in the latter is great, amounting to about 1 % of the dry weight. The myelo-Nadi-reaction is caused by V.P.O.

The isolated ferment is a high molecular compound, consisting of protein to which is firmly bound a colour-conditioning prosthetic group. Verdoperoxidase has a basic character, I. P.  $> 10$ .

The prosthetic group in V.P.O. is an iron-porphyrin compound whose constitution is as yet unknown. The iron content of the ferment is 0.1 %.

A method has been described for the determination of the content of oxido-reducible substances which in the oxidized and reduced forms have different absorption relations. With the help of this method, determination of the reduction equivalent can be carried out. — The value thus obtained for V.P.O. agrees with the iron content arrived at in other ways, and constitutes support for the assumption that iron enters into the prosthetic group of the ferment.

In the oxidized form, verdoperoxidase has spectroscopically observable absorption-bands at 690, 625, 570 and (500)  $m\mu$ . The reduced form has absorption-bands at 637 and 475  $m\mu$ . With hydrogen peroxide the ferment forms a peroxide compound with absorption-band at 628  $m\mu$ . Verdoperoxidase also forms spectroscopically observable derivatives with cyanide and azide ions and with hydroxyl amine, but not with fluoride and carbon monoxide.

The peroxidase activity of the ferment has on determination with purpurogalline test proved to have a value of about 1/10—1/20 of the corresponding value for plant-peroxidase. On account of the large content of V.P.O. in leucocytes, the strength of the peroxidase effect in leucocytes is about 6 times greater than that in horse-radish root per gram of substance.

Hydrogen cyanide, azide, hydroxyl amine and fluoride, but not carbon monoxide, inhibit the activity of the verdoperoxidase.

V.P.O. is resistant to the effect of alkali n/10, acetic acid n/1, and substances like alcohol and formalin; but it is inactivated by alkali n/1 and hydrochlorid acid n/10. The ferment is inactivated at 90° C.

Like plant-peroxidase, verdoperoxidase exhibits an aerobic oxidase activity on dihydroxymaleic acid.

The green colour in chloroleukemic infiltrates is caused by verdoperoxidase.

Besides verdoperoxidase, also two red coloured substances have been isolated from leucocyte-rich material. One of these has certain characteristics that distinguish cytochrome b. The other is characterized by an absorption-band at 495 m $\mu$ .

---

I wish to tender my warm thanks to Professor HUGO THEORELL for his unflagging interest in this work and for much valuable advice and criticism.

The author's thanks are also due to Stiftelsen Therese och Johan Anderssons minne for grants.

---



## References.

- ACHALME: C. r. Soc. Biol. 1899. *51*: 568.
- AGNER, K.: Biochem. J. 1938. *32*: 1702.
- , Naturw. 1939. *27*: 418.
- ALTSCHUL, A. M., ABRAMS, R. and HOGNESS, T. R.: J. Biol. Chem. 1939. *130*: 427.
- , ABRAMS, R. and HOGNESS, T. R.: J. Biol. Chem. 1940. *136*: 777.
- BATTELLI, F. and STERN, L.: Biochem. Z. 1912. *46*: 317, 342.
- , and STERN, L.: Biochem. Z. 1914. *67*: 443.
- BOURQUELOT, E. and BERTRAND, G.: C. r. Soc. Biol. 1895. *47*: 582.
- BRANDENBURG, K.: Münch. med. Wschr. 1900. *47*: 183.
- CHODAT, R. and BACH, A.: Ber. dtsh. chem. Ges. 1903. *36*: 606.
- v. CZYLARTZ, E. and v. FÜRTH, O.: Beitr. z. chem. Phys. u. Path. 1907. *10*: 358.
- EHRLICH, P.: Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. 1895.
- FISCHEL, R.: Wien. klin. Wschr. 1910. *23*: 1557.
- GAD and WURSTER, C.: Arch. Physiol. 1887. *11*: 337.
- v. GIERKE, E.: Münch. med. Wschr. 1911. *58*: 2315.
- GRÄFF, S.: Frankf. Zs. Path. 1912. *11*: 358.
- , Hdbch. biol. Arb.-Meth. 1922. *4*: 1, 93.
- , Beitr. path. Anat. 1922. *70*: 1.
- , Zbl. Path. 1922. *32*: 337.
- HARRISON, D. C.: Biochem. J. 1929. *23*: 982.
- HEILMEYER, L. and PLÖTNER, K.: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. 1937.
- HOPPE-SEYLER, F.: Ber. dtsh. chem. Ges. 1883. *16*: 117, 1917.
- KEILIN, D.: Proc. Roy. Soc. (B) 1925. *98*: 312.
- , Proc. Roy. Soc. (B) 1929. *104*: 206.
- , Nature 1933. *132*: 783.
- , Nature 1934. *133*: 290.
- and HARTREE, E. F.: Nature 1938. *141*: 870.
- and MANN, T.: Proc. Roy. Soc. (B) 1937. *122*: 119.
- KLEBS: Zbl. med. Wiss. 1868. *6*: 417.
- KUBOWITZ, F. and HAAS, E.: Biochem. Z. 1932. *255*: 247.
- LEMBERG, R., CORTIS-JONES, B. and NORRIE, M.: Nature 1937. *139*: 1016.
- , CORTIS-JONES, B. and NORRIE, M.: Nature 1937. *140*: 65.

- LEMBERG, R., CORTIS-JONES, B. and NORRIE, M.: *Biochem. J.* 1938. *32*: 149, 171.
- , LEGGE, J. W. and LOCKWOOD, W. H.: *Biochem. J.* 1939. *33*: 1, 754.
- , NORRIE, M. and LEGGE, J. W.: *Nature* 1939. *144*: 551.
- , and WYNDHAM, R. A.: *J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales* 1937. *70*: 343.
- LINOSSIER, G.: *C. r. Soc. Biol.* 1898. *50*: 373.
- LOEW, O.: *U. S. Depart. of Agric. Report.* 1901. N:o 68.
- MAC MUNN, C. A.: *Phil. Trans. Roy. Soc.* 1886. *177*: 267.
- , *J. Physiol.* 1887. *8*: 51.
- , *Z. physiol. Chem.* 1889. *13*: 497.
- MANCINI, S.: *Biochem. Z.* 1910. *26*: 140.
- MEYER, E.: *Münch. med. Wschr.* 1903. *50*: 1489.
- MOTTESSIER, J.: *C. r. Soc. Biol.* 1904. *56*: 373.
- MÖLLERSTRÖM, J.: *C. r. Soc. Biol.* 1928. *98*: 1361.
- NEGELEIN, E.: *Biochem. Z.* 1933. *266*: 412.
- NEUMANN, A.: *Biochem. Z.* 1924. *148*: 524.
- , *Biochem. Z.* 1924. *150*: 256.
- NIKOLAJEW, K.: *Biochem. Z.* 1928. *194*: 244.
- PETRY, E.: *Wien. klin. Wschr.* 1908. *21*: 1360.
- , *Biochem. Z.* 1912. *38*: 92.
- RAUDNITZ, R.: *Zbl. Physiol.* 1899. *12*: 790.
- , *Z. Biol.* 1901. *42*: 91.
- ROCHE and BÉNÉVENT: *Bull. Soc. Chim. biol.* 1936. *18*: 1650.
- RÖHMANN, F. and SPITZER, W.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1895. *28*: 567.
- SCHULTZE, W. H.: *Beitr. path. Anat.* 1909. *45*: 127.
- SCHÖNBEIN, C. F.: *Verh. naturforsch. Ges., Basel.* 1855. *1*: 339.
- SPITZER, W.: *Pflügers Arch.* 1897. *67*: 615.
- STERN, K. G.: *J. Biol. Chem.* 1936. *112*: 661.
- STRUVE, H.: *Liebigs Ann.* 1872. *163*: 160.
- SUMNER, J. B. and DOUNCE, A. L.: *J. Biol. Chem.* 1939. *127*: 439.
- , and HOWELL, S. F.: *Enzymologia* 1936. *1*: 133.
- SWEDIN, B. and THEORELL, H.: *Nature* 1940. *143*: 71.
- v. SZENT-GYÖRGYI, A.: *Biochem. Z.* 1924. *150*: 195.
- THEORELL, H.: *Biochem. Z.* 1938. *298*: 242.
- , *Enzymologia* 1939. *24*: 88.
- , *Annual Rev. Biochem.* 1940. *9*: 664.
- , *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi* 1941. *14 B*: N:o 20.
- , Not yet published. 1941.
- , and SWEDIN, B.: *Naturw.* 1939. *27*: 95.
- , and ÅKESSON, Å.: *J. Am. Chem. Soc.* 1941. In print.
- TISELIUS, A.: *Trans. Faraday Soc.* 1937. *32*: 524.
- TRAUBE, M.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1882. *15*: 659, 2421, 2434.
- TSCHERNORUZI, M.: *Z. physiol. Chem.* 1911. *75*: 216.
- VERNON, H. M.: *J. Physiol.* 1911. *42*: 402.
- , *J. Physiol.* 1911. *43*: 96.
- , *J. Physiol.* 1912. *44*: 150.
- WARBURG, O.: *Biochem. Z.* 1921. *119*: 134.

- WARRBURG, O.: *Biochem. Z.* 1927. 187: 255.  
—, and NEGELEIN, E.: *Biochem. Z.* 1928. 202: 202.  
—, and NEGELEIN, E.: *Biochem. Z.* 1929. 214: 82.  
—, and NEGELEIN, E.: *Biochem. Z.* 1933. 262: 237.  
—, NEGELEIN, E. and HAAS, E.: *Biochem. Z.* 1933. 266: 1.  
—, and CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.* 1932. 254: 438.  
WEISS, J.: *Zbl. med. Wiss.* 1891. 29: 722, 753.  
WILLSTÄTTER, R. and POLLINGER: *Liebigs Ann.* 1923. 430: 269.  
—, and STOLL, A.: *Liebigs Ann.* 1918. 416: 21.  
WINKLER, F.: *Folia haemat.* 1907. 4: 323.  
YOSHIDA, H.: *Chem. Soc.* 1883. 43: 472.  
ZEILE, K. and HELLSTRÖM, H.: *Z. physiol. Chem.* 1930. 192: 171.  
—, and MEYER, H.: *Z. physiol. Chem.* 1939. 262: 178.  
—, and MEYER, H.: *Naturw.* 1939. 35: 596.
-

